



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA

Programa de Doctorado en Biotecnología

Mecanismos de regulación post-traduccionaI de transportadores de la membrana plasmática: Papel de las quinasas Hal4 y Hal5 en el tráfico de transportadores de nutrientes e iones en el organismo modelo *Saccharomyces cerevisiae*

Cecilia Primo Planta

TESIS DOCTORAL

Dirigida por:

Lynne Yenush

Valencia, junio 2015

Esta Tesis Doctoral ha sido financiada por el Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) (Beca/contrato JAE Predoctoral a CP) y por el Ministerio de Ciencia e Innovación, Madrid (BFU2008-04188-C03-02 y BFU2011-30197-C03-03).

RESUMEN

Las proteínas quinasa de *Saccharomyces cerevisiae* Sat4 (Hal4) y Hal5 son necesarias para la estabilidad del transportador de K⁺ de alta afinidad Trk1 y de algunas permeasas de aminoácidos y de glucosa. El análisis transcriptómico del mutante *hal4 hal5* reveló que la ausencia de estos genes origina alteraciones generales en el metabolismo de aminoácidos y de glucosa, datos que confirmamos mediante la medida de la ruta Gcn2-Gcn4, de la toma de metionina y de leucina, de la actividad de la succinato deshidrogenasa (SDH), del consumo de glucosa y de la producción de etanol.

En esta Tesis, hemos demostrado que la permeasa de alta afinidad de metionina, Mup1 se degrada en la vacuola en ausencia de un suplemento de potasio en el mutante *hal4 hal5*, igual que otras permeasas de la membrana plasmática como Hxt1, Can1, Fur4 y Gap1. Esta desestabilización de Mup1 podría explicar el defecto en la toma de metionina observado y sugiere que Hal4 y Hal5 están implicadas en un mecanismo general de regulación de la estabilidad de las permeasas en la membrana plasmática. Esta hipótesis fue corroborada mediante estudios con inhibidores de la endocitosis y mutantes en la E3 ubiquitina ligasa Rsp5, responsable de la ubiquitinación y posterior degradación vacuolar de las permeasas estudiadas.

El proceso de ubiquitinación, en muchos casos, precisa de adaptadores específicos para reconocer la proteína diana. Se han descrito 19 proteínas adaptadoras de Rsp5, entre las que se encuentran 9 proteínas ARTs (Adaptadores de tráfico relacionados con arrestina). En este trabajo, hemos investigado si existe una conexión funcional entre las quinazas Hal4 y Hal5 y los ARTs; este mecanismo podría explicar los fenotipos observados. Estudiamos si Art1, regulador de la endocitosis de Mup1 y Can1, está implicado en la internalización de estas permeasas en la cepa *hal4 hal5*. Nuestros datos indican que Art1 no es necesario para la internalización de Mup1 y Can1 en una cepa *hal4 hal5* en ausencia de un suplemento de potasio, sugiriendo un papel novedoso de las quinazas Hal4 y Hal5. Ampliamos el estudio al transportador de ácido aspártico y glutámico, Dip5, cuya endocitosis viene mediada principalmente por Aly2 (Art3). Los resultados fueron positivos apoyando un mecanismo más general de regulación de las permeasas de la membrana plasmática por parte de estas quinazas.

Se ha propuesto que Npr1, una quinasa efectora del *Target of Rapamycin Complex 1* (TORC1), controla la actividad de Art1, Aly1 (Art6) y Aly2 (Art3) generando la acumulación de algunas permeasas en la membrana plasmática. Observamos menores niveles de expresión de Npr1 en mutantes *hal4 hal5*, además de un estado de hiperfosforilación constitutivo similar al de células WT en condiciones de potasio

limitante. Además, la sobreexpresión de *NPR1* rescata los defectos de crecimiento observados en medios con baja disponibilidad de potasio e inestabilidad de permeasas de la membrana plasmática descritos en el mutante *hal4 hal5*. Por tanto, identificamos parte de la ruta regulada por las quinasas Hal4 y Hal5.

En los organismos eucariotas TOR (*Target of Rapamycin*) existe en dos complejos multiproteicos distintos, complejo TOR1 (TORC1) y complejo TOR2 (TORC2). Hemos analizado los sustratos directos de TORC1 (Sch9) y TORC2 (Ypk1) en mutantes *hal4 hal5* y *trk1 trk2* y en condiciones de potasio limitante observando alteraciones en los niveles de fosforilación de ambos efectores. Finalmente, hemos observado que los mutantes *hal4 hal5* y *trk1 trk2* son altamente sensibles al inhibidor de TORC1, rapamicina y que esta sensibilidad se rescata con un exceso de potasio en el medio. Comprobamos que células tratadas con rapamicina presentan una disminución del potasio interno dependiente de TORC1 e independiente de Trk1 y Trk2. Por tanto, nuestros datos indican que las quinasas Hal4 y Hal5 tienen un efecto más específico sobre Npr1 y que hay una regulación recíproca entre el potasio y la ruta TOR.

RESUM

Les proteïnes quinasa de *Saccharomyces cerevisiae* Sat4 (Hal4) i Hal5 són necessàries per a l'estabilitat del transportador de K⁺ d'alta afinitat Trk1 i d'algunes permeases d'aminoàcids i de glucosa. L'anàlisi transcriptòmic d'una soca mutant *hal4 hal5* revela que l'absència d'aquests gens origina alteracions generals en el metabolisme d'aminoàcids i de glucosa, dades que confirmem mitjançant la mesura de la ruta Gcn2-Gcn4, de la presa de metionina i leucina, de l'activitat de succinat deshidrogenasa (SDH), del consum de glucosa i de la producció d'etanol d'aquest mutant.

En aquesta Tesi, hem demostrat que la permeasa d'alta afinitat de metionina, Mup1 es degrada en el vacúol en absència d'un suplement de potassi en el mutant *hal4 hal5*, igual que altres permeases de la membrana plasmàtica com Hxt1, Can1, Fur4 i Gap1. Aquesta desestabilització de Mup1 podria explicar el defecte en la presa de metionina observat i suggereix que Hal4 i Hal5 estan implicades en un mecanisme general de regulació de l'estabilitat de les permeases a la membrana plasmàtica. Aquesta hipòtesi va ser corroborada mitjançant estudis amb inhibidors de l'endocitosi i mutants en l'E3 ubiquitina ligasa Rsp5, responsable de la ubiquitinació i posterior degradació vacuolar de les permeases estudiades.

El procés d'ubiquitinació, en molts casos, precisa d'adaptadors específics per reconèixer la proteïna diana. Fins al moment s'han descrit 19 proteïnes adaptadores de Rsp5, entre les quals es troben 9 proteïnes ART (Adaptadors de trànsit relacionats amb arrestina). En aquest treball hem investigat si existeix una connexió funcional entre les quinases Hal4 i Hal5 i els ARTs; aquest mecanisme podria explicar els fenotips observats. Estudiem si Art1, regulador de l'endocitosi de Mup1 i Can1, està implicat en la internalització d'aquestes permeases a la soca *hal4 hal5*. Les nostres dades indiquen que Art1 no és necessari per a la internalització de Mup1 i Can1 en una soca *hal4 hal5* en absència d'un suplement de potassi, suggerint un paper nou de les quinases Hal4 i Hal5. Ampliem l'estudi per incloure el transportador d'àcid aspàrtic i glutàmic, Dip5, en l'endocitosi del qual intervé principalment Aly2 (Art3). Els resultats van ser positius recolzant un mecanisme més general de regulació de les permeases de la membrana plasmàtica per part d'aquestes quinases.

S'ha proposat que Npr1, una quinasa que és un efector del *Target of rapamycin Complex 1* (TORC1), controla l'activitat de Art1, Aly1 (Art6) i Aly2 (Art3) i genera l'acumulació d'algunes permeases a la membrana plasmàtica. Observem nivells menors d'expressió de Npr1 en mutants *hal4 hal5*, a més d'un estat d'hiperfosforilació constitutiu semblant al de cèl·lules WT en condicions de potassi limitant. A més, la sobreexpressió de la quinasa *NPR1* rescata parcialment els defectes de creixement

observats en medis amb baixa disponibilitat de potassi i la inestabilitat de permeases de la membrana plasmàtica descrits en el mutant *hal4 hal5*. Per tant, identifiquem part de la ruta regulada per les quinases Hal4 i Hal5.

En els organismes eucariotes, TOR (Target of rapamycin) existeix en dos complexos multiproteics diferents, complex TOR1 (TORC1) i complex TOR2 (TORC2). Hem analitzat els substrats directes de TORC1 (Sch9) i TORC2 (Ypk1) en mutants *hal4 hal5* i *trk1 trk2* i en condicions de potassi limitant observant alteracions en els nivells de fosforilació dels dos efectors. Finalment, hem observat que els mutants *hal4 hal5* i *trk1 trk2* són altament sensibles a l'inhibidor de TORC1, rapamicina, i que aquesta sensibilitat es rescatada amb un excés de potassi en el medi. Vam comprovar que cèl·lules tractades amb rapamicina presenten una disminució del potassi intern dependent de TORC1 e independent de Trk1 i Trk2. Per tant, les nostres dades indiquen que les quinases Hal4 i Hal5 tenen un efecte més específic sobre Npr1 i que hi ha una regulació recíproca entre el potassi i la ruta TOR.

ABSTRACT

The *Saccharomyces cerevisiae* protein kinases Sat4 (Hal4) and Hal5 are required for the plasma membrane stability of the high affinity K⁺ transporter Trk1 and some amino acid and glucose permeases. A transcriptomic analysis of the *hal4 hal5* strain revealed that the absence of these genes causes general alterations in the metabolism of amino acids and glucose. This data is confirmed by the following approaches: activity of the Gcn2-Gcn4 pathway, uptake of methionine and leucine, activity of succinate dehydrogenase (SDH), glucose consumption and ethanol production of this mutant.

In this Thesis, we demonstrated that the high affinity permease Mup1 is internalized and degraded in the vacuole in the absence of potassium supplementation, like other plasma membrane permeases such as Hxt1 (glucose), Can1 (arginine), Fur4 (uracil) and Gap1 (amino acids). This destabilization of the Mup1 permease is likely to explain the reduction in the uptake of methionine in the double mutant *hal4 hal5* and suggests that Hal4 and Hal5 are involved in a general mechanism of regulation of the stability of permeases in the plasma membrane. This hypothesis was corroborated by studies with inhibitors of endocytosis and mutant isoforms of the E3 ubiquitin ligase Rsp5, which is responsible for the ubiquitination and subsequent vacuolar degradation of the permeases studied.

The process of Rsp5-mediated ubiquitination requires, in many cases, specific adapters for recognition of the target protein. So far, 19 Rsp5 adapter proteins have been described, among which there are 9 ARTs proteins (Arrestin-Related Trafficking adaptor). In this study, we investigated whether there is a functional connection between Hal4 and Hal5 kinases and ARTs, since this mechanism could explain the observed phenotypes. We studied whether Art1, a regulator of Mup1 and Can1 endocytosis, is involved in the internalization of these permeases in *hal4 hal5* strains. Our data indicates that Art1 is not necessary for internalizing Mup1 in the *hal4 hal5* strain in the absence of potassium supplementation, therefore suggesting a new role for the Hal4 and Hal5 kinases. We extended the study to include the transporter of aspartic and glutamic acid, Dip5, whose endocytosis is mainly mediated by Aly2 (Art3). The results were positive, providing support for a more general mechanism of regulation of the permeases of the plasma membrane by these kinases.

It has been proposed that Npr1, a kinase that is an effector of the Target of Rapamycin Complex 1 (TORC1), controls the activity of Art1, Aly1 (Art6) and Aly2 (Art3), leading to the accumulation of some permeases in the plasma membrane. We observe lower expression levels of Npr1 in *hal4 hal5* strains. We also observe a state of constitutive hyperphosphorylation, similar to WT cells under limiting potassium. Furthermore,

overexpression of the *NPR1* kinase partially rescues the growth defects and instability of the permeases in the plasma membrane described in the *hal4 hal5* mutant. Therefore, we identify part of the pathway regulated by the Hal4 and Hal5 kinases.

In eukaryotes, TOR (Target of Rapamycin) exists in two distinct multiprotein complexes, TOR complex 1 (TORC1) and TOR complex 2 (TORC2). We have analyzed the direct substrates of TORC1 (Sch9) and TORC2 (Ypk1) in *hal4 hal5* and *trk1 trk2* mutants in potassium limiting conditions, observing alterations in the phosphorylation levels of both effectors. Finally, we observed that *hal4 hal5* and *trk1 trk2* mutants are highly sensitive to the TORC1 inhibitor, rapamycin, and that this sensitivity is rescued by increased external potassium. We confirmed that cells treated with rapamycin had lower internal potassium levels, an effect which is dependent on TORC1 and independent of Trk1 and Trk2. Therefore, our data indicates that the Hal4 and Hal5 kinases have a more specific effect on Npr1 and that there is a reciprocal regulation between potassium and the TOR signaling pathway.

ABREVIATURAS

ARTs	<i>Arrestin-Related Trafficking adaptors</i> (adaptadores de tráfico relacionados con arrestinas)
AZC	<i>L-Azetidine-2-carboxylic acid</i> (L-acetidina-2-ácido carboxílico)
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i> (albumina de suero bovino)
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementario
CHX	Cicloheximida
dCTP	<i>Deoxycytidine triphosphate</i> (deoxicitidina trifosfato)
DRM	<i>Detergent-Resistant Membrane</i> (membrana resistente a detergentes)
DMSO	Dimetil Sulfóxido
DO	Densidad Óptica
DTE	1,4-dithioerithritol
ECL	<i>Enhanced chemiluminescence</i> (quimioluminiscencia mejorada)
EE	<i>Early Endosome</i> (endosoma temprano)
ER	<i>Endoplasmic Reticulum</i> (retículo endoplasmático)
EDTA	Ácido etildiaminotetraacético
END	Vía endocítica
ESCRT	<i>Endosomal Sorting Complexes Required for Transport</i> (complejo de clasificación vacuolar requerido para el transporte)
FI	Fracción Insoluble
FS	Fracción Soluble
FDR	<i>False Discovery Rate</i> (probabilidad de error en la selección de un gen)
GAP1	<i>General Amino-Acid Permease 1</i> (permeasa general de aminoácidos 1)
GFP	<i>Green Fluorescent Protein</i> (proteína verde fluorescente)
GCN	<i>General Control of Nutrients</i> (control general de nutrientes)
GO	<i>Gene Ontology</i>
HA	Hemagglutinina
HECT	<i>Homologous to E6-AP C Terminus</i>
Kan	Kanamicina
LatA	Latrunculina A
LB	Medio Luria Bertani
LE	<i>Late Endosome</i> (endosoma tardío)
MAPK	<i>Mitogen Activated Protein Kinase</i> (proteína quinasa activada por mitógeno)
MAST	<i>Motif Alignment and Search Tool</i> (herramienta de alineamiento y búsqueda de motivos)
MCT	<i>Membrane compartment containing TORC2</i> (compartimento de la membrana que contiene a TORC2)
MES	Ácido 2-(N-Morfolino) etanosulfónico
MP	Membrana Plasmática
MPM	Membrana-Poro-Membrana
MVB	<i>Multivesicular Body</i> (cuerpo multivesicular)
Npr1	<i>Nitrogen permease reactivator</i> (reactivador permeasa nitrógeno)
NSC1	<i>Non-Specific Channel 1</i> (canal no específico 1)
NT	N-Terminal

nt	Nucleótidos
OLB	<i>Oligo Labelling Buffer</i> (tampón de marcaje)
ONPG	<i>2-Nitrophenyl β-D-galactopyranoside</i> (2 orto-nitrofenil-β-D-galactopiranosido)
ORF	<i>Open Reading Frame</i> (marco abierto de lectura)
PAS	<i>Pre-Autophagosomal Structure</i> (estructura pre-autofagosomal)
pb	Pares de bases nucleotídicas
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (reacción en cadena de la polimerasa)
PE	<i>Phosphatidyl Ethanolamine</i> (fosfatidil etanolamina)
PEG	Polietilenglicol
PI3P	<i>Phosphatidylinositol 3-phosphate</i> (fosfatidil inositol-3-fosfato)
PI4,5P₂	<i>Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate</i> (fosfatidilinositol 4,5-bifosfato)
PonS	Ponceaus
PtdIns3K	<i>Phosphatidylinositol-3-kinase</i> (fosfatidilinositol-3-quinasa)
PY	Motivo de aminoácidos que contiene PPxY
RAP	Rapamicina
RCY	Vía de reciclaje
RING	<i>Really Interesting New Gene</i> (nuevo gen realmente interesante)
RNA_m	RNA mensajero
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i> (especies reactivas de oxígeno)
rpm	Revoluciones por minuto
SCD	<i>Synthetic Complete Drop-out</i> (medio mínimo completo)
SD	Medio mínimo sintético
SDH	Succinato deshidrogenasa
SDS	<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i> (dodecil sulfato sódico)
SDS-PAGE	<i>Sodium Dodecyl Sulfate PolyAcrylamide Gel Electrophoresis</i> (electroforesis en gel de poliacrilamida-dodecil sulfato sódico)
SEC	Vía Secretora
SGD	<i>Saccharomyces Genome Database</i> (base de datos del genoma de <i>Saccharomyces</i>)
SPT	<i>Serine palmitoyltransferase</i> (serina-palmitoil transferasa)
SSC	<i>Sodium Saline Citrate</i> (citrato salino sódico)
TBS	<i>Tris-Buffered-Saline</i> (tampón salino ajustado con Tris)
TCA	<i>Trichloroacetic acid</i> (ácido tricloroacético)
TGN	<i>Trans Golgi Network</i> (red del trans-Golgi)
TOR	<i>Target of Rapamycin</i> (diana de la rapamicina)
TORC1	<i>TOR Complex 1</i> (complejo TOR1)
TORC2	<i>TOR Complex 2</i> (complejo TOR2)
Ub	Ubiquitina
UBD	<i>Ubiquitin Binding Domains</i> (dominios de unión a ubiquitina)
VAC	Vacuola
Vps	<i>Vacuolar protein sorting</i> (proteína de clasificación vacuolar)
WASP	<i>Wiskott-Aldrich Syndrome Protein</i> (proteína del síndrome Wiskott-Aldrich)
WT	<i>Wild type</i> (cepa silvestre)
YNB	<i>Yeast nitrogen base</i>
YPD	<i>Yeast Extract-Peptone-Dextrose</i> (medio rico)
5-FOA	<i>5-Fluoroorotic acid</i> (ácido 5-fluoroorótico)

INDICE

Introducción	1
1. El transporte de nutrientes e iones en el organismo modelo <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	1
2. Regulación de los transportadores de la membrana plasmática	2
2.1. Endocitosis.....	3
2.2. Internalización y tráfico dependiente de ubiquitina de los transportadores de la membrana plasmática.....	6
2.2.1. La señal de ubiquitina y el tráfico de las vesículas endocíticas.....	6
2.2.2. La maquinaria ESCRT.....	8
3. Ubiquitinación	9
3.1. Tipos de ubiquitinación.....	9
3.2. La reacción de ubiquitinación y las enzimas ubiquitina ligasas.....	11
4. Rsp5, una ubiquitina ligasa de tipo HECT	11
4.1. Rsp5: Estructura y función.....	12
4.2. Rsp5: Mecanismo de regulación.....	13
4.2.1. Fosforilación de Rsp5	13
4.2.2. Proteínas adaptadoras de Rsp5.....	14
4.2.2.1. Adaptadores a nivel de la ruta endosomal	14
4.2.2.2. Adaptadores a nivel de la membrana plasmática.....	15
5. La familia de proteínas ARTs	16
5.1. Características estructurales y funcionales de la familia de proteínas ARTs	16
5.2. Modo de acción de la familia de proteínas ARTs.....	18
5.3. Regulación de la interacción transportador-adaptador-Rsp5: modificaciones post-traduccionales y rutas de señalización	21

6. La ruta de señalización TOR (<i>Target of Rapamycin</i>).....	23
6.1. La rapamicina y su mecanismo de acción	23
6.2. Estructura de la proteína quinasa TOR.....	24
6.3. Funciones celulares de la proteína quinasa TOR en <i>S. cerevisiae</i>	25
6.4. Complejos multiproteicos de la proteína quinasa TOR: TORC1 y TORC2 en <i>S. cerevisiae</i>	25
6.5. Señalización del Complejo TOR1 (TORC1)	27
6.5.1. Quinasa Sch9 como sustrato del complejo TOR1 (TORC1)	28
6.5.2. Complejo Tap42-fosfatasa como sustrato del complejo TOR1 (TORC1)	28
6.5.3. Otros sustratos del complejo TOR1 (TORC1): quinasa Npr1	30
6.6. Señalización del Complejo TOR2 (TORC2)	33
7. La homeostasis de iones en el organismo modelo <i>S. cerevisiae</i>	36
7.1. El transporte de K ⁺ y su relevancia funcional	40
7.2. Sistemas de transporte de K ⁺ y su regulación	41
7.2.1. El sistema de alta afinidad de transporte de K ⁺ Trk1-Trk2	41
7.2.2. Las proteínas quinasas Hal4 y Hal5 y otras quinasas de la familia NPR/HAL5	43
8. Papel de las quinasas Hal4 y Hal5 en la regulación de Trk1 y otros transportadores de la membrana plasmática	45
Objetivos	49
Materiales y Métodos	51
1. Cultivo y manipulación celular	51
1.1. Bacterias	51
1.2. Levaduras	51
1.2.1. Ensayos de crecimiento en medio sólido (goteos).....	52
1.2.1.1. Evaluación de transformantes por el método de selección con ácido 5-fluoroorótico (5-FOA)	53
1.2.2. Ensayos de crecimiento en medio líquido	54

1.2.3. Tratamientos celulares en medio líquido	54
2. Técnicas de transferencia génica	57
2.1. Transformación en bacteria	57
2.2. Transformación simple en levadura	57
2.3. Transformación de alta eficiencia en levadura.....	57
3. Técnicas de manipulación genética	58
3.1. Extracción de plásmidos en <i>E. coli</i> y <i>S. cerevisiae</i>	58
3.2. Generación de plásmidos	58
3.3. Generación de la cepa mutante <i>hal4 hal5 art1</i>	61
4. Técnicas de detección de moléculas de RNA o <i>Northern blot</i>	62
4.1. Extracción y electroforesis de RNA total de levadura.....	62
4.2. Transferencia del RNA a membrana	63
4.3. Obtención, purificación y marcaje radioactivo de fragmentos (sondas) de DNA	63
4.4. Hibridación de las membranas con la sonda radioactiva y cuantificación de la señal	64
5. Ensayos de Doble Híbrido.....	65
6. Obtención de extractos proteicos.....	65
6.1. Obtención de extractos proteicos de células enteras (extractos crudos)	65
6.2. Obtención de extractos proteicos de las fracciones soluble e insoluble	65
7. Técnicas de inmunodetección de proteínas o <i>Western blot</i>	66
7.1. Electroforesis de proteínas y transferencia a membrana	66
7.2. Inmunodetección de proteínas transferidas a membrana.....	67
8. Análisis de fosforilación de Npr1, Sch9 y Ypk1	68
8.1. Ensayo de fosforilación de las quinasas Sch9 y Ypk1 por empleo de anticuerpos fosfoespecíficos	68
8.2. Ensayo de fosforilación de la quinasa Npr1 por alteración en la movilidad electroforética.....	69
9. Estudio de la localización celular de proteínas por microscopía confocal	70

10. Otras medidas fisiológicas en células de levadura	70
10.1. Medida del consumo de glucosa	70
10.2. Medida de la producción de etanol.....	70
10.3. Medida de la toma de metionina	70
10.4. Medida de la concentración intracelular de K ⁺	71
11. Tratamiento estadístico de datos.....	71

Resultados.....73

CAPITULO 1. PAPEL DE LAS QUINASAS HAL4 Y HAL5 EN LA TOMA DE NUTRIENTES 73

1. Rastreo dirigido a identificar las dianas de Hal4 y Hal5.....	73
2. Análisis transcriptómico del mutante <i>hal4 hal5</i>	73
3. Metabolismo respiratorio en el mutante <i>hal4 hal5</i>	76
4. Toma de metionina en el mutante <i>hal4 hal5</i>	77
4.1. Estabilidad de la permeasa Mup1 en el mutante <i>hal4 hal5</i> en condiciones limitantes de KCl	78
4.2. Acumulación de la permeasa Mup1 en el mutante <i>hal4 hal5</i> en condiciones de ayuno de metionina	81
4.3. Regulación de Mup1 por la familia ARTs: ensayos de doble híbrido	83
4.4. Ensayos de interacción genética entre las proteínas Mup1, Art1 y Art2 del fondo genético BY4741.....	85

CAPITULO 2. PAPEL DE LAS QUINASAS HAL4 Y HAL5 EN EL TRAFICO DE TRANSPORTADORES DE LA MEMBRANA PLASMATICA 89

1. Implicación de las quinasas Hal4 y Hal5 en la endocitosis.....	89
2. Acumulación vacuolar dependiente de la ubiquitinación: implicación de las quinasas Hal4 y Hal5.....	90

3. Análisis genético de la posible implicación de la familia de adaptadores ARTs en la acumulación vacuolar de permeasas observada en el mutante <i>hal4 hal5</i>.....	94
3.1. Estudio de la estabilidad de la permeasa Mup1 en una cepa triple mutante <i>hal4 hal5 art1</i> en diferentes condiciones	95
3.1.1. Estudio de la estabilidad de la permeasa Mup1 en condiciones de exceso de metionina en el medio	95
3.1.2. Estudio de la estabilidad de la permeasa Mup1 en condiciones de KCl limitante.....	97
3.2. Estudio de la estabilidad de la permeasa Can1 en una cepa triple mutante <i>hal4 hal5 art1</i> en diferentes condiciones	100
3.2.1. Estudio de la estabilidad de la permeasa Can1 en condiciones de exceso de arginina en el medio.....	101
3.2.2. Estudio de la estabilidad de la permeasa Can1 en condiciones de KCl limitante.....	106
3.3. Estudio de la estabilidad del transportador Trk1 en una cepa triple mutante <i>hal4 hal5 art1</i> en condiciones de KCl limitante	108
3.4. Estudio de la estabilidad de la permeasa Dip5 en una cepa mutante <i>hal4 hal5</i> en condiciones de KCl limitante	109
4. Estudio de la posible implicación de las quinasas Hal4 y Hal5 en la ruta de señalización TORC1	112
4.1. Estudio de la estabilidad de la permeasa Mup1 en células WT y <i>hal4 hal5</i> durante un tratamiento con rapamicina	113
4.2. Regulación de Npr1 en una cepa <i>hal4 hal5</i>	114
4.2.1. Análisis <i>Western blot</i> de la acumulación y fosforegulación de la quinasa Npr1	114
4.2.2. Análisis de la transcripción de <i>NPR1</i>.....	118
4.2.3. Efecto de la sobreexpresión de <i>NPR1</i>	119
4.2.4. Estudio del efecto de la sobreexpresión de <i>NPR1</i> en la estabilidad de los transportadores de la membrana plasmática.....	124
4.3. Análisis de la capacidad supresora de componentes de la ruta TORC1 en mutantes <i>hal4 hal5</i>	127

CAPITULO 3. ESTUDIO DE LA POSIBLE CONEXION ENTRE LA HOMEOSTASIS DE POTASIO Y LA RUTA DE SEÑALIZACION TOR.....	131
1. Caracterización del K⁺ como posible señal de la ruta TOR.....	131
1.1. Estudio de la estabilidad de la permeasa Can1 en la membrana plasmática en condiciones de ayuno de KCl.....	131
1.2. Estudio de la proteína marcadora del proceso de autofagia Atg8 en condiciones de ayuno de KCl	134
1.3. Estudio de las quinasas Sch9 y Ypk1, sustratos directos de los complejos TORC1 y TORC2, en condiciones de ayuno de potasio	136
2. Análisis fisiológico de la posible relación funcional entre la ruta TOR y la homeostasis de iones	139
2.1. Análisis fenotípico de los mutantes viables de los componentes de los complejos TORC1 y TORC2 en diferentes condiciones.....	139
2.2. Análisis de la relación funcional entre la homeostasis de iones y la ruta TOR a través de la rapamicina	143
3. Estudio del efecto de la rapamicina en el contenido de potasio intracelular.....	146
Discusión	149
Conclusiones	161
Bibliografía	163
Anexos	179
Anexo I. Jorge Pérez-Valle, Jessica Rothe, Cecilia Primo, Mar Martínez Pastor, Joaquín Ariño, Amparo Pascual-Ahuir, José Miguel Mulet, Ramón Serrano, and Lynne Yenush (2010). Hal4 and Hal5 Protein Kinases Are Required for General Control of Carbon and Nitrogen Uptake and Metabolism	179

INDICE DE FIGURAS Y TABLAS

Introducción:

Figura 1. Representación de las diferentes vías de tráfico intracelular en levadura	3
Figura 2. Proceso de internalización endocítica	5
Figura 3. Representación esquemática de la regulación endocítica de los transportadores de la membrana plasmática en <i>S. cerevisiae</i>	6
Figura 4. Modelo de clasificación del <i>cargo</i> en la ruta multivesicular y ensamblaje secuencial del complejo <i>ESCRT</i>	9
Figura 5. Influencia de la estructura de la señal de ubiquitinación en la función de la proteína diana	10
Figura 6. Esquema de la estructura de los dominios de la proteína Rsp5.....	12
Figura 7. Modelo de regulación de la actividad de Rsp5 dependiente de fosforilación.....	13
Tabla 1. Ejemplos de permeasas en levadura sujetas a la degradación vacuolar dependiente de Rsp5.....	16
Figura 8. Miembros de la familia de proteínas ARTs en levadura.....	17
Figura 9. Endocitosis de <i>cargos</i> mediada por los ARTs	19
Figura 10. Modelo de regulación por nutrientes del tráfico de Gap1 dependiente de las proteínas Art3 y Art6.....	20
Figura 11. Resumen de las funciones de los adaptadores "ARTs"	21
Figura 12. El complejo FKBP-rapamicina se une e inhibe a TOR	24
Figura 13. Complejo TOR1 (TORC1) y complejo TOR2 (TORC2) de <i>S. cerevisiae</i>	27
Figura 14. Modelo de regulación de las fosfatasas por TORC1	30
Figura 15. Mecanismo de regulación de la endocitosis dependiente de TORC1	32
Figura 16. Principales transportadores catiónicos intracelulares y de la membrana plasmática en <i>S. cerevisiae</i>	37
Figura 17. Modelo de regulación del sistema de transporte de potasio Trk1.....	42
Figura 18. Representación esquemática de las 112 proteínas quinasas de <i>S. cerevisiae</i>	43
Figura 19. Localización subcelular de permeasas de nutrientes en las cepas silvestre, <i>hal4 hal5</i> y <i>trk1 trk2</i>	46

Materiales y Métodos:

Tabla 2. Cepas de <i>S. cerevisiae</i> utilizadas en este trabajo	52
Tabla 3. Tabla resumen de los tratamientos realizados en medio sólido en este trabajo	53
Tabla 4. Tabla resumen de los tratamientos realizados en medio líquido en este trabajo en función de la proteína de estudio	56
Tabla 5. Oligonucleótidos empleados para la amplificación de los genes <i>ART1, ART2, ART3, ART4, ART5, ART6, ART7, ART8</i> y <i>ART9</i>	60
Tabla 6. Oligonucleótidos empleados en este trabajo para la generación de sondas	64
Tabla 7. Anticuerpos empleados en este trabajo	67

Resultados:

CAPITULO 1. PAPEL DE LAS QUINASAS HAL4 Y HAL5 EN LA TOMA DE NUTRIENTES

Tabla 8. Categorías funcionales de los genes regulados diferencialmente en el mutante <i>hal4 hal5</i>	74
Figura 20. Cambios en el metabolismo respiratorio en el mutante <i>hal4 hal5</i> : consumo de glucosa	76
Figura 21. Cambios en el metabolismo respiratorio en el mutante <i>hal4 hal5</i> : producción de etanol.....	77
Figura 22. Toma de metionina en la cepa silvestre y en el mutante <i>hal4 hal5</i>	78
Figura 23. Localización subcelular de la permeasa de metionina Mup1-GFP en la cepa silvestre y en el mutante <i>hal4 hal5</i> en condiciones de potasio limitante.....	79
Figura 24. Análisis <i>Western blot</i> de la proteína Mup1 en la cepa silvestre y en el mutante <i>hal4 hal5</i> en condiciones de potasio limitante	80
Figura 25. Localización subcelular de la permeasa Mup1-GFP en la cepa silvestre y en el mutante <i>hal4 hal5</i> en condiciones de ayuno de metionina.....	82
Figura 26. Análisis <i>Western blot</i> de la proteína Mup1 en la cepa silvestre y en el mutante <i>hal4 hal5</i> en condiciones de ayuno de metionina.....	83
Figura 27. Ensayo de doble híbrido entre el extremo N-terminal de Mup1 y los miembros de la familia ARTs: Art1, Art2, Art3 y Art4.....	84

Figura 28. Condiciones de visualización en la membrana plasmática de la permeasa Mup1-GFP en el fondo genético BY4741	86
Figura 29. Acumulación en la membrana plasmática de la permeasa Mup1-GFP en las cepas silvestre, <i>art1</i> y <i>art2</i> del fondo genético BY4741 en medio sin y con metionina	87
Figura 30. Análisis <i>Western blot</i> de la proteína Mup1 en la cepa silvestre y los mutantes <i>art1</i> y <i>art2</i> del fondo genético BY4741 en medio sin y con metionina	88

CAPITULO 2. PAPEL DE LAS QUINASAS HAL4 Y HAL5 EN EL TRAFICO DE TRANSPORTADORES DE LA MEMBRANA PLASMATICA

Figura 31. Efecto del inhibidor de la endocitosis Latrunculina A sobre la degradación vacuolar de Mup1 en un mutante <i>hal4 hal5</i>	90
Figura 32. Ensayos de crecimiento con el análogo tóxico de la prolina AZC de una cepa silvestre y <i>hal4 hal5</i> transformadas con los plásmidos que portan la versión silvestre de Rsp5 así como las versiones mutadas T357A y T357D	92
Figura 33. Ensayos de crecimiento en condiciones limitantes de KCl de una cepa silvestre y <i>hal4 hal5</i> transformadas con los plásmidos que portan la versión silvestre de Rsp5 así como las versiones mutadas T357A y T357D	93
Figura 34. Localización subcelular de la permeasa de metionina Mup1-GFP en la cepa silvestre y en los mutantes <i>art1</i> , <i>hal4 hal5</i> y <i>hal4 hal5 art1</i> en condiciones de exceso de metionina	96
Figura 35. Análisis <i>Western blot</i> de la proteína Mup1 en la cepa silvestre y en los mutantes <i>art1</i> , <i>hal4 hal5</i> y <i>hal4 hal5 art1</i> en condiciones de exceso de metionina	97
Figura 36. Localización subcelular de la permeasa de metionina de Mup1-GFP en la cepa silvestre y en los mutantes <i>art1</i> , <i>hal4 hal5</i> y <i>hal4 hal5 art1</i> en condiciones de KCl limitante.....	99
Figura 37. Análisis <i>Western blot</i> de la proteína Mup1 en la cepa silvestre y en los mutantes <i>art1</i> , <i>hal4 hal5</i> y <i>hal4 hal5 art1</i> en condiciones de KCl limitante.....	100
Figura 38. Localización subcelular de la permeasa de arginina Can1-GFP en la cepa silvestre y en los mutantes <i>art1</i> , <i>hal4 hal5</i> y <i>hal4 hal5 art1</i> en condiciones de exceso de arginina	102
Figura 39. Ensayos de crecimiento en SD y SCD de cepas del fondo genético W303-1A transformadas con y sin el plásmido pVT100-CAN1-GFP.....	103

Figura 40. Localización subcelular de la permeasa de arginina Can1-GFP en la cepa silvestre y en los mutantes <i>art1</i> , <i>hal4 hal5</i> y <i>hal4 hal5 art1</i> en medio SCD.....	104
Figura 41. Ensayos de crecimiento en medio sólido SD suplementado con los aminoácidos metionina (MET), arginina (ARG) y lisina (LYS), así como la combinación arginina y lisina en cepas del fondo genético W303-1A sin transformar y transformadas con el plásmido pVT100-CAN1-GFP.....	105
Figura 42. Localización subcelular de la permeasa de arginina Can1-GFP en la cepa silvestre y en los mutantes <i>art1</i> , <i>hal4 hal5</i> y <i>hal4 hal5 art1</i> en condiciones de KCl limitante.....	107
Figura 43. Análisis <i>Western blot</i> de la proteína Trk1 en la cepa silvestre y en los mutantes <i>art1</i> , <i>hal4 hal5</i> y <i>hal4 hal5 art1</i> en condiciones de KCl limitante.....	108
Figura 44. Análisis <i>Western blot</i> de la proteína Dip5 en la cepa silvestre y en la cepa mutante <i>hal4 hal5</i> en condiciones de KCl limitante.....	110
Figura 45. Localización subcelular de la permeasa de ácido aspártico/glutámico Dip5-GFP en la cepa silvestre y en la cepa mutante <i>hal4 hal5</i> en condiciones de KCl limitante.....	111
Figura 46. Análisis <i>Western blot</i> de la proteína Mup1 en la cepa silvestre y en la cepa mutante <i>hal4 hal5</i> ante un tratamiento con rapamicina.....	113
Figura 47. Análisis <i>Western blot</i> de la acumulación y alteración en la movilidad electroforética de la proteína Npr1 en las cepas silvestre, <i>hal4 hal5</i> y <i>trk1 trk2</i> en diferentes condiciones.....	115
Figura 48. Análisis de la alteración en la movilidad electroforética de la proteína Npr1 en la cepa silvestre y en la cepa mutante <i>hal4 hal5</i> en condiciones de ayuno de potasio.....	117
Figura 49. Análisis de la transcripción génica de <i>NPR1</i> en células de la cepa silvestre BY4741, <i>hal4 hal5</i> y <i>npr1</i> en condiciones de KCl limitante.....	118
Figura 50. Ensayos de crecimiento en medio mínimo con y sin suplemento de KCl en cepas <i>hal4 hal5</i> del fondo genético BY4741 transformadas con el plásmido de sobreexpresión pWS93-NPR1 y el plásmido control pWS93.....	120
Figura 51. Evaluación de transformantes <i>hal4 hal5 pWS93-NPR1</i> seleccionados por el método de selección 5-FOA.....	121

Figura 52. Ensayos de crecimiento en SD con y sin suplemento de KCl en una cepa silvestre, <i>hal4 hal5</i> y <i>trk1 trk2</i> del fondo genético BY4741 transformadas con el plásmido de sobreexpresión pWS93-NPR1 y el plásmido control pWS93	122
Figura 53. Ensayos de crecimiento en diferentes condiciones de las cepas silvestre, <i>hal4 hal5</i> y <i>trk1 trk2</i> del fondo genético BY4741 transformadas con el plásmido de sobreexpresión pWS93-NPR1 y el plásmido control pWS93	123
Figura 54. Efecto de la sobreexpresión de <i>NPR1</i> en la localización subcelular de la permeasa de metionina Mup1-GFP en una cepa <i>hal4 hal5</i> en condiciones de KCl limitante	125
Figura 55. Análisis <i>Western blot</i> del efecto de la sobreexpresión de <i>NPR1</i> en la localización subcelular de la proteína Mup1 en una cepa <i>hal4 hal5</i> en condiciones de KCl limitante	126
Figura 56. Análisis <i>Western blot</i> del efecto de la sobreexpresión de <i>NPR1</i> en la acumulación de la proteína Trk1 en una cepa <i>hal4 hal5</i> en condiciones de KCl limitante	127
Figura 57. Ensayos de crecimiento de una cepa silvestre y <i>hal4 hal5</i> transformadas con los plásmidos que portan la versión silvestre e hiperactiva de <i>TOR1</i> (YcP- <i>TOR1_{WT}</i> y YcP- <i>TOR1_{LM}</i>), la versión silvestre e inactivas de <i>SCH9</i> (YcP- <i>SCH9</i> , YcP- <i>SCH9_{K441A}</i> y YcP- <i>SCH9_{D556T}</i>) y la versión silvestre de <i>NPR1</i> en un vector centromérico (YcP- <i>NPR1</i>) y multicopia (YEp- <i>NPR1</i>), en un fondo genético BY4741	129

CAPITULO 3. ESTUDIO DE LA POSIBLE CONEXION ENTRE LA HOMEOSTASIS DE POTASIO Y LA RUTA DE SEÑALIZACION TOR

Figura 58. Localización subcelular de la permeasa de arginina Can1-GFP en la cepa silvestre en condiciones de ayuno de KCl.....	133
Figura 59. Análisis <i>Western blot</i> de la proteína Can1 en condiciones de ayuno de KCl	133
Figura 60. Análisis <i>Western blot</i> del flujo autofágico en condiciones de ayuno de KCl empleando la proteína GFP-Atg8.....	135
Figura 61. Análisis <i>Western blot</i> de la fosforilación de las quinasas Sch9 y Ypk1 en la cepa silvestre y las cepas mutantes <i>hal4 hal5</i> y <i>trk1 trk2</i> en condiciones de ayuno de KCl.....	137
Figura 62. Cuantificación de los niveles de fosforilación relativos de las quinasas Sch9 y Ypk1 en la cepa silvestre y las cepas mutantes <i>hal4 hal5</i> y <i>trk1 trk2</i> en condiciones de ayuno de KCl	138

Figura 63. Ensayos de crecimiento de una cepa silvestre y de los mutantes *tor1*, *tco89*, del complejo TORC1, *avo2*, *bit61*, del complejo TORC2, *hal4 hal5* y *trk1 trk2* en medio YPD e YPD suplementado con LiCl 100 mM..... 141

Figura 64. Ensayos de crecimiento de los mutantes *tor1*, *tco89*, del complejo TORC1, *avo2*, *bit61*, del complejo TORC2, *hal4 hal5* y *trk1 trk2* en medio líquido *Translucent* suplementado con diferentes concentraciones de KCl..... 142

Figura 65. Ensayos de crecimiento de una cepa silvestre y de los mutantes *hal4 hal5*, *trk1 trk2*, *brp1*, *ptk2* y *ppz1* en medio sólido YPD con rapamicina 144

Figura 66. Ensayos de crecimiento de una cepa silvestre y de los mutantes *ptk2*, *brp1*, *ppz1*, *hal4 hal5* y *trk1 trk2* en medio sólido YPD con rapamicina sin y con suplemento de KCl o sorbitol 145

Figura 67. Contenido intracelular de potasio en una cepa silvestre y en los mutantes *trk1 trk2* y *fpr1* ante un tratamiento con rapamicina 146

Discusión:

Modelo de la regulación positiva de Npr1 por Hal4 y Hal5..... 155

Modelo de la regulación recíproca entre la ruta TORC1 y el potasio 159

Introducción

1. El transporte de nutrientes e iones en el organismo modelo *Saccharomyces cerevisiae*

Todas las células eucariotas contienen una amplia variedad de proteínas integrales de membrana, tanto plasmática como de orgánulos internos, cuya función es asegurar un correcto transporte de nutrientes e iones. Este transporte es empleado por las células para el mantenimiento, crecimiento y desarrollo celular.

Las proteínas transportadoras son fundamentales ya que permiten la entrada y salida de solutos que incluyen iones, compuestos orgánicos, péptidos pequeños, agua etc. a través de la bicapa lipídica de la membrana plasmática, así como el flujo o compartimentalización de estos solutos en orgánulos intracelulares como la mitocondria, la vacuola, los peroxisomas o los orgánulos de secreción. En este sentido, estos transportadores ejercen un control importante de todas las actividades celulares o bien por el hecho de que se encargan de transportar nutrientes al interior celular o bien porque pueden actuar como receptores de las señales de nutrientes extracelulares que inician la maquinaria celular específica. Las proteínas con esta doble función como transportador y proteína señalizadora se llaman transeptores (Holsbeeks et al., 2004). Otras funciones de las proteínas transportadoras son proporcionar resistencia a drogas o la tolerancia salina, así como el control del volumen celular y la salida de metabolitos nocivos.

Los transportadores de membrana son una de las clases de proteínas más abundantemente representadas en los análisis proteómicos celulares (Brohée et al., 2010). El porcentaje estimado de transportadores de membrana varía entre un 2-10% en bacterias, 2-7% en eucariotas y es del 2.7% para la especie humana (Ren et al., 2007). En levaduras, la mayoría de las proteínas transportadoras identificadas tienen un alto porcentaje de similitud de secuencia con proteínas encontradas en otros organismos, desde bacterias hasta humanos (Saier et al., 2009). Estas proteínas de transporte pueden ser clasificadas en tres categorías principales: canales iónicos, transportadores (también llamados permeasas, facilitadores o *carriers*) y bombas (ATPasas).

La levadura *Saccharomyces cerevisiae* se convirtió en un modelo ideal para estudiar la homeostasis de nutrientes e iones hace más de 50 años. Las razones para utilizar esta levadura como organismo modelo de células eucariotas son las que se describen a continuación: su compleja organización intracelular compartida con eucariotas superiores, la disponibilidad de la secuencia del genoma completa (la primera de las células eucariotas) (Goffeau et al., 1996; Nelissen et al., 1997), la predicción integral *in silico* de todos los transportadores (Nelissen et al., 1997), su rápido crecimiento, así

como la disponibilidad de herramientas genéticas para generar mutantes. Todas ellas lo convierten en un sistema excelente para identificar los transportadores de nutrientes e iones y sus reguladores. Sin embargo, pese a que muchos transportadores ya han sido identificados en este organismo modelo, el conocimiento de las proteínas que modulan la actividad transportadora en levadura es todavía un campo de investigación en expansión.

2. Regulación de los transportadores de la membrana plasmática

La disponibilidad de nutrientes clave como azúcares, aminoácidos y compuestos nitrogenados determina la tasa de crecimiento y la viabilidad de las células de levadura. Ante estas señales, un gran número de rutas de señalización, como por ejemplo las rutas de señalización en la que están implicadas la proteína quinasa A, la quinasa dependiente de AMP (Snf1) y el complejo *Target of Rapamycin* TORC1, responden integrando señales sobre la disponibilidad de nutrientes. De este modo, ante dichos cambios, las proteínas transportadoras de la membrana pueden sufrir una regulación a dos niveles: a nivel de transcripción génica y a nivel de tráfico de proteínas de membrana (Broach, 2012).

Un ejemplo de regulación a nivel transcripcional es la inducida por la glucosa. La mayoría de sus transportadores están codificados por los genes *HXT*, y el patrón de expresión de esta familia de transportadores responde a la cantidad y calidad de la fuente de carbono en el entorno. Se ha observado que la transcripción del gen *HXT1*, que codifica para un transportador de baja afinidad y alta capacidad, se induce sólo ante altas concentraciones de glucosa, mientras que la inducción de *HXT3* se observa tanto a altos como a bajos niveles de glucosa. Es probable que Hxt1 y Hxt3 sean responsables del transporte de glucosa en células creciendo con altas concentraciones de glucosa (Boles and Hollenberg, 1997; Reifenberger et al., 1997). Por otro lado, la expresión de *HXT2*, *HXT4*, *HXT6* y *HXT7*, que codifican para transportadores de alta afinidad, se inducen sólo ante bajas concentraciones de glucosa (Reifenberger et al., 1997).

La regulación transcripcional de genes que codifican para transportadores de nutrientes es un mecanismo de adaptación importante. Sin embargo, en los últimos veinte años, un gran número de estudios se han centrado en la regulación de los transportadores de levadura a nivel de tráfico.

En células eucariotas, tanto las proteínas de membrana como las proteínas secretadas o residentes dentro de los orgánulos son generalmente translocadas al retículo

endoplasmático (ER) durante su síntesis. Posteriormente deben ser transportadas a su correcto compartimento con el objetivo de cumplir su función, sufrir modificaciones o degradarse. Los diferentes compartimentos presentes en la levadura *S. cerevisiae* y las diferentes vías de tráfico que los conectan se representan a continuación (Figura 1).

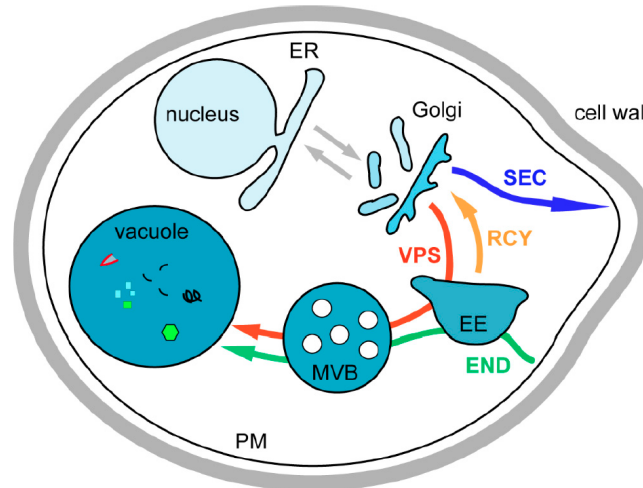


Figura 1. Representación de las diferentes vías de tráfico intracelular en levadura. Las proteínas solubles y las proteínas de membrana son sintetizadas en el retículo endoplasmático (ER) y transportadas al aparato de Golgi (transporte anterógrado) (flecha gris). En el aparato de Golgi, estas proteínas se clasifican en: vesículas de transporte retrogrado devolviendo las proteínas al ER (flecha gris), en vesículas secretoras (SEC) para conducir las proteínas hacia la membrana plasmática o al medio externo (proteínas extracelulares) (flecha azul) y en vesículas con proteínas de clasificación vacuolar (VPS) para conducir proteínas a la vacuola y que pasan a través de los endosomas (flecha roja). La vía endocítica (END) se emplea para la internalización de proteínas de la membrana plasmática y componentes del medio extracelular (flecha verde). En los endosomas tempranos (EE) las proteínas son clasificadas entre aquellas cuyo destino es la degradación en la vacuola tras su paso por los endosomas tardíos (LE) y cuerpos multivesiculares (MVB) y aquellas que siguen la vía de reciclaje (RCY), para evitar su degradación, siendo destinadas al aparato de Golgi (flecha naranja) (Feyder et al., 2015).

En este trabajo de Tesis Doctoral nos centraremos en la vía de endocitosis y la posterior degradación vacuolar de transportadores de nutrientes y de iones.

2.1. Endocitosis

La vía endocítica (END) en levadura participa en la regulación de la cantidad de proteínas de membrana de la superficie celular. Cuando las condiciones ambientales cambian, la endocitosis es necesaria para comenzar el proceso de degradación de permeasas que ya no son necesarias o que pueden resultar dañinas para la célula. Dicho mecanismo implica complejos procesos de remodelación de la composición de la superficie celular que incluyen, además de la toma de moléculas extracelulares como nutrientes, la eliminación de *cargos* de la membrana plasmática que determinan cómo las células interactúan con su ambiente.

La vía endocítica permite la internalización de las proteínas de la membrana plasmática hacia el interior celular, generando su transporte a través de los

endosomas tempranos (EE) y endosomas tardíos/cuerpos multivesiculares (LE/MVB), antes de alcanzar la vacuola para su degradación o para ser transportados de vuelta al TGN para su reciclaje (Figura 1) (Conibear, 2010).

La endocitosis puede ser dividida en dos categorías en base al material internalizado. **Fagocitosis** (fase sólida), que se refiere a la internalización de partículas grandes (< 200 nm) y tiene lugar a través de un mecanismo dependiente del citoesqueleto de actina y **pinocitosis** (fase líquida), que se refiere a la internalización del medio extracelular y puede tener lugar a través de cuatro mecanismos distintos: endocitosis dependiente de **clatrina**, endocitosis medida por **caveola**, **macropinocitosis** y endocitosis **independiente de dinamina y clatrina**. La endocitosis dependiente de clatrina implica la formación de vesículas cubiertas de clatrina a través de un mecanismo dependiente también de actina y, a diferencia con los otros tipos de endocitosis, se trata de un proceso esencial en casi todas las células (Seto et al., 2002).

Aunque la internalización de los *cargos* de la membrana plasmática puede tener lugar a través de estos diferentes mecanismos de endocitosis, en este trabajo nos vamos a centrar en la endocitosis dependiente de clatrina, que es la que ha sido más caracterizada hasta ahora y que ha sido demostrado que juega un papel crítico en la endocitosis de muchos *cargos* de la membrana plasmática.

Gracias a un estudio genético que permitió el aislamiento de mutantes de endocitosis (*end*), se demostró que en *S. cerevisiae* la endocitosis depende principalmente de actina (Munn and Riezman, 1994; Munn et al., 1995). La caracterización de estos mutantes *end* junto con otros mutantes aislados en otros abordajes genéticos reveló que estos genes mutados codificaban para actina (Act1), proteínas relacionadas con actina (Arp2/Arp3), efectores de polimerización de actina WASP (*Wiskott-Aldrich Syndrome Protein*) (Las17) o efectores ligados al citoesqueleto de actina (Sla2, Pan1, Rvs161/167) (Madania et al., 1999; Moreau et al., 1997; Munn et al., 1995). El papel de estas proteínas se describe en la siguiente figura (Figura 2).

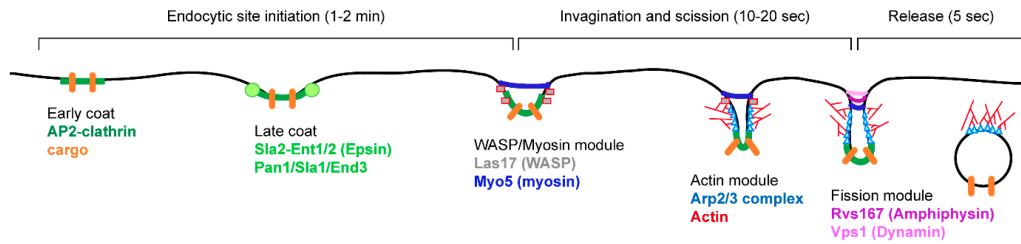


Figura 2. Proceso de internalización endocítica. Los sitios de endocitosis son iniciados por el reclutamiento de clatrina vía el complejo adaptador AP-2 (cubierta temprana) con el fin de agrupar los *cargos* en los sitios de invaginación endocíticos de la membrana plasmática. La fase de iniciación termina con el reclutamiento de las proteínas Sla2 y las epsinas Ent1 y Ent2 para formar la cubierta tardía. La invaginación comienza con el reclutamiento del módulo de miosina/WASP para iniciar la polimerización ramificada de actina por el módulo de actina (complejo Arp2/3 y actina). La miosina exprime la membrana plasmática mientras que el módulo de actina expande la invaginación. Una vez la invaginación es suficiente larga, el módulo de fisión comienza el cierre del cuello de las vesículas en formación hasta liberarlas en el citoplasma (Feyder et al., 2015).

Los mecanismos que gobiernan la formación de vesículas a partir de las membranas celulares están generalmente bien conservados; los componentes de la maquinaria endocítica en células de mamíferos poseen sus homólogos en levadura y algunos estudios han demostrado que estas proteínas son reclutadas por la maquinaria endocítica en la misma secuencia temporal en levadura y en mamíferos (Kaksonen et al., 2006; Perrais and Merrifield, 2005). Sin embargo, a pesar de estas similitudes, también se han observado grandes diferencias (Baggett and Wendland, 2001; Galletta and Cooper, 2009; Robertson et al., 2009). Por ejemplo, adaptadores de clatrina como AP-2, que son imprescindibles en la unión del *cargo* con la vesícula cubierta en mamíferos, no lo son en levadura, o mientras que la dinamina es crucial para la escisión vesicular en mamíferos, las proteínas de la familia dinamina no juegan el mismo papel en levadura (Nannapaneni et al., 2010; Yu and Cai, 2004). Respecto a la endocitosis caveolar, en levadura se han identificado los eisomas, unas invaginaciones profundas de la membrana plasmática que se piensa deben de ser el equivalente de las caveolas en mamíferos (Parton and del Pozo, 2013). También se ha observado que mientras que la actina no es imprescindible en células de mamíferos, es fundamental para la endocitosis en levadura.

Cabe destacar también, que de manera general en ambos tipos de células, el tráfico intracelular de proteínas está típicamente controlado por la disponibilidad de sustrato, las condiciones generales de suministro de nutrientes y/o las condiciones de estrés. Además, la previa ubiquitinación de algunas proteínas de la membrana plasmática es un fenómeno común y necesario para producir su internalización. De hecho, se ha observado que muchos receptores y transportadores se ubiquitan tras unirse a su ligando o en condiciones de exceso de sustrato, respectivamente (Galan et al., 1996; Hein et al., 1995a; Hicke and Riezman, 1996).

2.2. Internalización y tráfico dependiente de ubiquitina de los transportadores de la membrana plasmática

En la figura 3, se ilustra el mecanismo general de tráfico intracelular de un transportador que tiene lugar en el organismo modelo *S. cerevisiae*. Los distintos pasos de este proceso se discutirán a continuación.

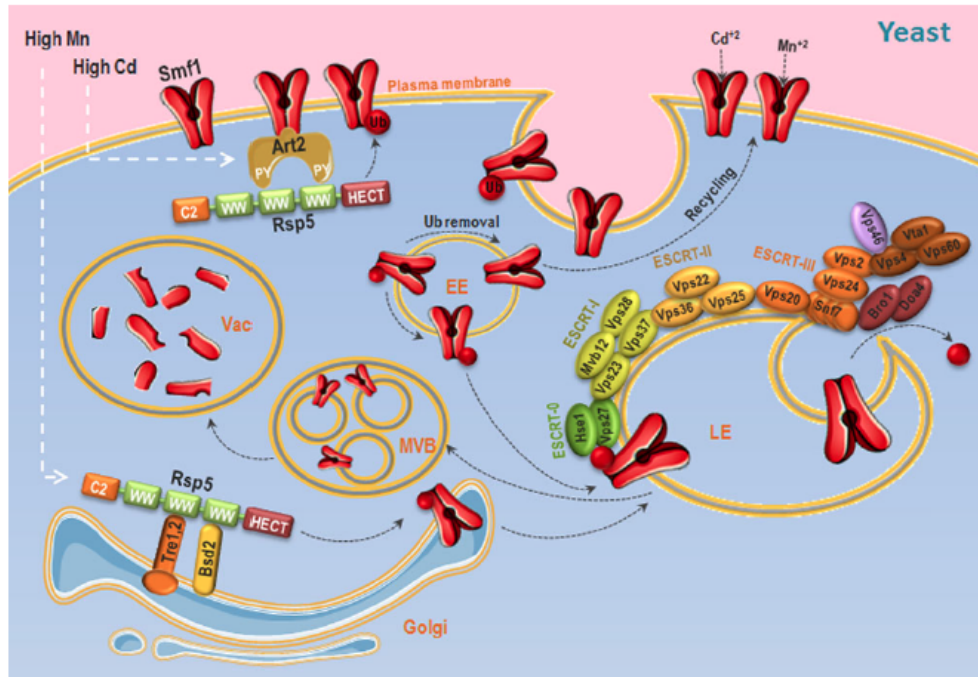


Figura 3. Representación esquemática de la regulación endocítica de los transportadores de la membrana plasmática en *S. cerevisiae*. Transportadores de la membrana plasmática como Smf1, que pueden haber sido fosforilados previamente, son ubiquitinados por la ubiquitina ligasa Rsp5 desencadenando su internalización. Esta ubiquitinación en la membrana puede ser mediada por la acción de proteínas adaptadoras con motivos PY, como por ejemplo Art2 (Ecm21). Según las condiciones del entorno el mismo transportador puede ser directamente enviado desde el Golgi hasta la vacuola. Este proceso también requiere que los transportadores sean ubiquitinados por Rsp5 gracias a la ayuda de otras proteínas adaptadoras de Rsp5. Finalmente, tras su paso por los endosomas tempranos (EE), los transportadores ubiquitinados que se encuentran en los endosomas tardíos (LE) son clasificados e incorporados en la ruta de los cuerpos multivesiculares (MVB) gracias al complejo *ESCRT*. Las proteínas ubiquitinadas originarias del aparato de Golgi o de la membrana plasmática son primero desubiquitinadas antes de internalizarse en las vesículas MVB. Tras la fusión de los MVB con la vacuola, estas proteínas son degradadas por proteasas vacuolares (Mulet et al., 2013).

2.2.1. La señal de ubiquitina y el tráfico de las vesículas endocíticas

El proceso de transporte del material extracelular o de la membrana plasmática desde la superficie celular hacia la vacuola que tiene lugar a través de la vía endocítica, ha sido definido como un proceso de reorganización espacial y temporal morfológico y bioquímico de los distintos compartimentos organelares que incluyen a las vesículas (con los *cargos*), a los endosomas tempranos, a los endosomas tardíos/cuerpos

multivesiculares y a las vacuolas (Griffiths and Gruenberg, 1991). Un requisito imprescindible en este proceso es la ubiquitinación inicial del *cargo*.

La ubiquitinación, es una modificación post-traducciona en la cual un polipéptido de 76 aminoácidos conocido como ubiquitina (Ub) se une covalentemente a una proteína diana al formarse un enlace isopeptídico entre el ácido carboxílico de la glicina terminal, que encontramos en el motivo di-glicina de la ubiquitina activada, con el grupo ϵ -amino del residuo de lisina de la proteína diana (Pickart, 2001). Este proceso se describe en detalle más adelante. Pero, es importante destacar que la unión covalente del polipéptido ubiquitina es una señal conocida que promueve principalmente la degradación de las proteínas por el proteosoma o la internalización de proteínas de la membrana plasmática (Hicke, 1997; Hochstrasser, 1996). Además de su papel en los primeros pasos de la endocitosis, la ubiquitina también es importante para la clasificación de los *cargos* en los cuerpos multivesiculares (MVB) (Katzmann et al., 2002). En este trabajo, nos centramos en el papel de la ubiquitinación en promover la internalización y posterior degradación vacuolar de proteínas de la membrana plasmática. Se ha propuesto que las proteínas de membrana ubiquitinadas son reconocidas y clasificadas en vesículas endocíticas gracias a las familias de proteínas Ent1 y Ent2 (tipo Epsin en humanos) y Edel (Eps15 en humanos), que poseen uno a varios dominios de unión a ubiquitina (UBD). Esta interacción es la responsable de mediar la clasificación del *cargo* ubiquitinado en vesículas endocíticas, cómo se ha demostrado en células de mamíferos (Duncan et al., 2006; Miranda and Sorkin, 2007).

Una vez los *cargos* ubiquitinados se internalizan en vesículas, estas pequeñas vesículas endocíticas primarias llegan a los endosomas tempranos. Estos endosomas tempranos, además de aceptar *cargos* de la membrana plasmática, también reciben *cargos* procedentes del Golgi que luego redistribuyen hacia el Golgi, hacia la membrana plasmática en vesículas de reciclaje o hacia los endosomas tardíos (Figura 1). Aunque las proteínas de la superficie celular pueden ser recicladas desde los endosomas tempranos de vuelta a la membrana plasmática o al aparato de Golgi, en este trabajo nos vamos a centrar en su transporte hacia la vacuola (Figura 3).

Sobre el mecanismo de tráfico entre los endosomas, existe un debate sobre si las vesículas mueven los *cargos* desde los endosomas tempranos a los endosomas tardíos por un mecanismo de fusión de vesículas o si alternativamente estos primeros maduran para formar estos endosomas tardíos (Griffiths and Gruenberg, 1991; Murphy, 1991). Independientemente del modelo, los endosomas tempranos y tardíos se pueden distinguir en base al tiempo que necesitan para alcanzar el compartimento desde la superficie, a los marcadores de membrana, a la localización en la célula, a su pH y a la morfología. Los endosomas tardíos característicamente poseen vesículas internas y por esta razón son a menudo llamados cuerpos multivesiculares (MVB) o

endosomas multivesiculares (Cullen, 2011; Hopkins et al., 1990; Huotari and Helenius, 2011). Así pues, en los endosomas tardíos, las proteínas pueden permanecer en la membrana externa limitante o ser clasificadas en las vesículas lumbales más internas, si las proteínas están ubiquitinadas. Este proceso culmina con la fusión de los MVB con la vacuola que resulta en la liberación de estas vesículas internas y de sus *cargos* asociados en el lumen de la vacuola, donde son degradadas por las proteasas vacuolares y las lipasas (Lauwers et al., 2010).

2.2.2. La maquinaria *ESCRT*

La entrada del transportador ubiquitinado en la ruta del cuerpo multivesicular, ya sea procedente de la membrana plasmática o del aparato de Golgi, requiere el marcaje del *cargo* con la ubiquitina y viene mediada por el complejo *ESCRT* (*Endosomal Sorting Complexes Required for Transport*) o Complejo de Clasificación Endosomal Requerido para el Transporte (Katzmann et al., 2002). Esta maquinaria está compuesta por cinco complejos multi-subunidad denominados *ESCRT-0*, -I, -II, -III y Vsp4-Vta1 (Hurley and Emr, 2006). De cada uno de los complejos *ESCRT-0*, -I y -II, al menos un componente contiene un dominio de unión a ubiquitina UBD, por lo que esos complejos funcionarían de manera cooperativa dirigiendo a los *cargos* ubiquitinados hacia los cuerpos multivesiculares (Shields et al., 2009).

Los componentes del complejo *ESCRT* fueron caracterizados inicialmente en levadura como parte de los llamados mutantes de clasificación vacuolar o *vps* (*vacuolar protein sorting*) por carecer de la habilidad de transportar proteínas a la vacuola. De estos 46 mutantes *vps*, se identificaron 13 que dieron lugar a una posterior identificación de las proteínas *Vps* de clase E, encargadas de la clasificación de los *cargos* en los MVB y que están conservadas desde hongos a mamíferos (Raiborg and Stenmark, 2009). Estas proteínas *Vps* de clase E, son los componentes mayoritarios de los cuatro complejos heteroméricos conocido como *ESCRT*. Estos complejos, son reclutados transitoriamente desde el citoplasma hacia la membrana endosomal donde inician una serie de sofisticadas redes de interacciones que se resumen esquemáticamente en la figura 4.

Cada uno de los tres complejos *ESCRT* (-0, -I y -II) pueden interactuar con los *cargos* ubiquitinados, y parece probable que cooperan de alguna manera para conducir las proteínas de membrana ubiquitinadas en la ruta MVB. Los *cargos* son por tanto transferidos desde un complejo *ESCRT* hacia el siguiente, como en una cinta transportadora. Alternativamente, *ESCRT-0*, -I y -II podrían interactuar simultáneamente con diferentes proteínas de membrana generando un dominio de clasificación en la superficie de los endosomas que madura en un sitio de formación de cuerpos multivesiculares. Por otra parte, *ESCRT-III* también sirve de plataforma para la

maquinaria de desubiquitinación que recicla la ubiquitina de los *cargos* del MVB antes de la formación de vesículas (Luhtala and Odorizzi, 2004).

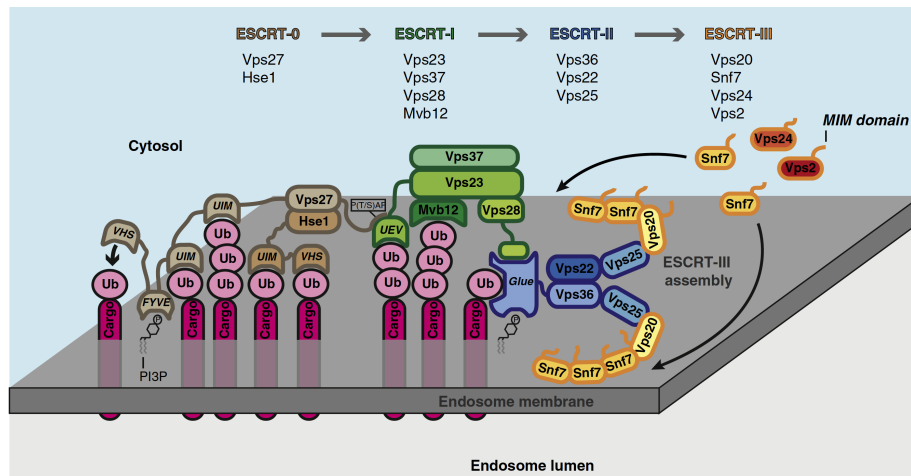


Figura 4. Modelo de clasificación del *cargo* en la ruta multivesicular y ensamblaje secuencial del complejo *ESCRT*. *ESCRT-0* (marrón) inicia la vía de los cuerpos multivesiculares (MVB) interactuando con el fosfolípido endosomal fosfatidil inositol-3-fosfato (PI3P) y agrupando las proteínas ubiquitinadas de la membrana vía los dominios de unión a ubiquitina. *ESCRT-I* (verde) es reclutado por *ESCRT-0* (Vps27) y se une también al *cargo* ubiquitinado. *ESCRT-II* (azul) interactúa vía el dominio *Glue* de Vps36 con *ESCRT-I*, PI3P y el *cargo*. La subunidad Vps25 de *ESCRT-II* sirve como punto de nucleación para el montaje paso a paso del complejo filamentososo *ESCRT-III* (amarillo-naranja) el cual secuestra al *cargo* conduciendo la vesícula hacia el interior celular (vacuola) (Schmidt and Teis, 2012).

Por último, el complejo **Vps4** es una ATPasa que invierte la energía de la hidrólisis del ATP en poder mecánico que se traduce en el desensamblaje de la estructura *ESCRT* y por tanto permite el reciclaje en el citoplasma de sus subunidades individuales (Nickerson et al., 2006; Rue et al., 2008; Saksena et al., 2009). Una vez completado este desensamblaje, el complejo Vps4 se disocia en su forma inactiva. De esta manera, el complejo Vps4 termina cada ronda de clasificación del *cargo* en los MVB y la formación de vesículas.

3. Ubiquitinación

3.1. Tipos de ubiquitinación

Existen diversas formas de modificaciones con ubiquitina: la **monoubiquitinación** es la unión de una única ubiquitina a una proteína, la **multiubiquitinación** tiene lugar cuando varios residuos de lisina de una misma proteína diana son marcados con moléculas de ubiquitina individuales y la **poliubiquitinación** implica la adición de una cadena de ubiquitinas que están unidas por el residuo C-terminal de glicina de la primera ubiquitina y un residuo específico de lisina interno de las ubiquitinas en la cadena. Se ha observado que la monoubiquitinación o la multiubiquitinación son

necesarias para la entrada de ciertos *cargos* en las vesículas en distintos estados de la vía secretora/endocítica, mientras que la poliubiquitinación ha sido principalmente asociada con la degradación proteosomal, aunque ciertamente tiene una función más amplia (Hicke, 2001; Pickart and Fushman, 2004). En el caso de la poliubiquitinación, puede haber al menos siete uniones diferentes entre ubiquitinas ya que hay siete residuos de lisina diferentes en la molécula de ubiquitina (K6, K11, K27, K29, K33, K48 y K63) y todos ellos son diana para la conjugación con otra ubiquitina (Xu et al., 2009). El papel de las diferentes uniones en las poliubiquitinas ha comenzado a elucidarse en los últimos años y todas las posibles uniones de ubiquitina han sido observadas en las células (Kulathu and Komander, 2012). Sin embargo, los tipos de cadena de poliubiquitinas más abundantes y por tanto más estudiadas en profundidad son aquellas unidas a través de la lisina 48 (K48) y aquellas formadas por la unión de ubiquitinas a través de la lisina 63 (K63). En general, las cadenas de poliubiquitinas formadas por la unión de ubiquitinas a través de la lisina 48 (Ub^{K48}) están implicadas principalmente en el direccionamiento hacia el proteosoma. La unión con la lisina 63 (Ub^{K63}) posee varias funciones importante en la señalización celular, una de las cuales consiste en dirigir la endocitosis y/o la degradación vacuolar de las proteínas diana (Komander and Rape, 2012). También juega un papel importante en la respuesta inflamatoria y la síntesis proteica ribosomal (Pickart and Fushman, 2004).

En la figura 5 se muestra un esquema de los distintos tipos de ubiquitinación y las funciones celulares en las que se encuentran implicadas.

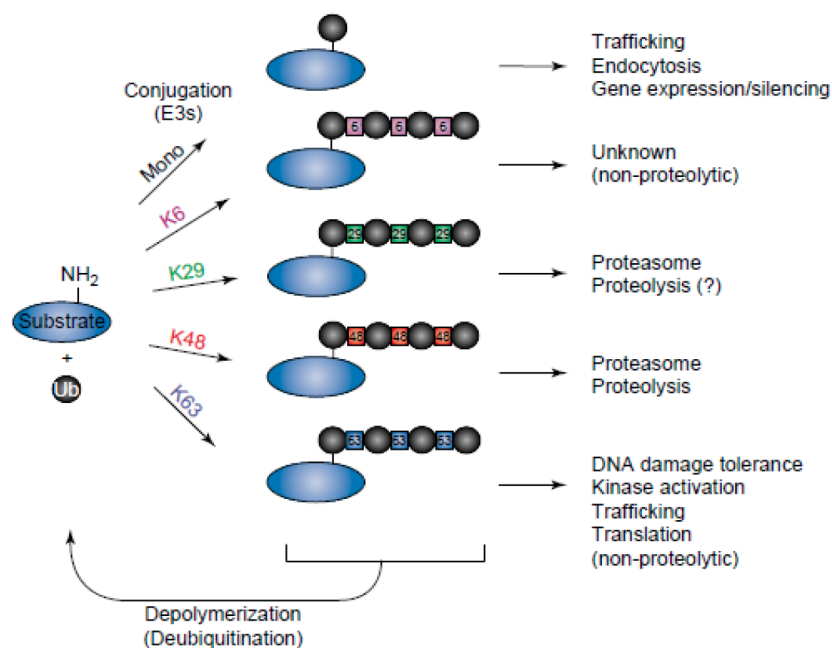


Figura 5. Influencia de la estructura de la señal de ubiquitinación en la función de la proteína diana. Los diferentes colores de las Ub hacen referencia al cambio del tipo de unión entre ubiquitinas (Pickart and Fushman, 2004).

3.2. La reacción de ubiquitinación y las enzimas ubiquitina ligasas

La formación del enlace entre una ubiquitina y el residuo de lisina de una proteína diana requiere tres reacciones secuenciales catalizadas por una enzima ubiquitina activadora E1, una enzima ubiquitina conjugadora E2 y una enzima ubiquitina ligasa E3.

En general, los genomas codifican para pocas enzimas activadoras E1. En levadura, sólo hay un gen específico que codifica para esta enzima, y en el genoma humano, igual que en *Arabidopsis thaliana*, sólo hay dos genes específicos. En el caso de las enzimas conjugadoras E2, existen muchos más (11 en levadura y alrededor de 35 y 40 en humanos y en *A. thaliana*, respectivamente). Sin embargo, la mayor diversidad existe en las enzimas ubiquitina ligasas E3. Se estima que existen más de 50 genes que codifican para E3 ubiquitina ligasas en *S. cerevisiae*, unos 600 en el genoma humano e incluso más de 1000 en *A. thaliana* (Mulet et al., 2013). Esta gran diversidad en las familias de E3 ubiquitina ligasas puede explicarse por el hecho de que estas proteínas dirigen interacciones entre proteínas y porque específicamente interaccionan con una vasta cantidad de sustratos diana de ubiquitinación.

Existen dos familias principales de E3s ubiquitina ligasas: la familia RING (*Really Interesting New Gene*) (616 genes en humanos y 40 en levadura) y la familia HECT (*Homologus to E6-AP C Terminus*) (28 genes en humanos y 5 en levadura) (Metzger et al., 2012). Estas dos familias son funcionalmente distintas. La familia RING ubiquitina ligasas sirve de intermediario para facilitar la transferencia directa de una molécula de ubiquitina desde la enzima E2 a la proteína diana, es decir, ponen en contacto directo a la E2 y al sustrato. A diferencia con la familia RING, los miembros de la familia HECT participan en la transferencia catalítica de una ubiquitina a la proteína diana. La ubiquitina activa se transfiere por la enzima E2 a un residuo interno de cisteína (Cys) de la E3 que posteriormente es conjugada a un residuo de lisina de la proteína diana.

Las familias de E3 ubiquitina ligasas de tipo HECT incluyen a la familia de ubiquitina ligasas Nedd4, de las cuales hay 9 enzimas en humanos y una en *S. cerevisiae*, la proteína esencial Rsp5 (Gajewska et al., 2003; Huibregtse et al., 1995).

4. Rsp5, una ubiquitina ligasa de tipo HECT

Uno de los mayores avances realizados en el entendimiento del proceso de endocitosis y posterior degradación en la vacuola de los transportadores fue, además del descubrimiento del papel jugado por la ubiquitina, la identificación de la ubiquitina

ligasa en levadura, Rsp5, un elemento clave en este proceso en particular (Rotin *et al.*, 2000). El producto del gen *NPI1* (*nitrogen permease inactivator*), originalmente identificado como un factor implicado en la represión inducida por amonio de la permeasa general de aminoácidos Gap1 (Grenson, 1983), se identificó posteriormente como la ubiquitina ligasa Rsp5 (Hein *et al.*, 1995a; Hein *et al.*, 1995b; Huibregtse *et al.*, 1995; Huibregtse *et al.*, 1994). Su papel en la ubiquitinación de permeasas fue también ilustrado con la permeasa de uracilo Fur4 (Galan *et al.*, 1996). Tras estos primeros descubrimientos, se demostró que muchos más transportadores de la membrana experimentan esta ubiquitinación dependiente de Rsp5 en la membrana plasmática (Lauwers *et al.*, 2010).

4.1. Rsp5: Estructura y función

Rsp5 y sus homólogos en mamíferos (familia Nedd4), se caracterizan por poseer una estructura modular con: un dominio N-terminal de tipo C2 (principalmente conocido como dominio de unión a lípidos) responsable de la asociación a membranas, una región central que contiene entre dos a cuatro dominios WW (3 en Rsp5) y un dominio catalítico de tipo HECT en su extremo C-terminal (Figura 6).



Figura 6. Esquema de la estructura de los dominios de la proteína Rsp5.

Los dominios WW son módulos de interacción proteína-proteína de 40 aminoácidos que pueden ser clasificados en cuatro subtipos en función de la especificidad de la unión. Experimentos de doble híbrido indican que los dominios WW de Rsp5 y Nedd4 son dominios WW del grupo I ya que se unen a secuencias consensos de PPxY. Estos consisten en dos prolinas adyacentes seguidas por cualquier aminoácido y luego una tirosina. Se denominan motivos PY (Rotin *et al.*, 2000). Los dominios WW permiten la interacción de Rsp5 con algunos de sus sustratos (McNatt *et al.*, 2007; Oestreich *et al.*, 2007; Shcherbik *et al.*, 2004; Stawiecka-Mirota *et al.*, 2007; Watson and Bonifacino, 2007).

Esta familia de E3 ubiquitina ligasas de tipo HECT participa en muchas funciones celulares como la regulación transcripcional, la exportación del RNAm, la condensación de la cromatina y la síntesis de ácidos grasos insaturados (Arnason *et al.*, 2005; Beaudenon *et al.*, 1999; Gwizdek *et al.*, 2005; Harkness *et al.*, 2002; Hoppe *et al.*, 2000; Rodriguez *et al.*, 2003; Shcherbik *et al.*, 2004; Shcherbik *et al.*, 2003). También se sabe que Rsp5 está implicado en la herencia mitocondrial y la distribución proteica mitocondria-citoplasma, aunque en estos casos los mecanismos no están bien definidos (Fisk and Yaffe, 1999; Zoladek *et al.*, 1997). Otra función importante que se le atribuye a Rsp5, similar a la de su homólogo Nedd4-2, es la ubiquitinación de un gran número de proteínas de la membrana plasmática (Belgareh-Touzé *et al.*, 2008).

4.2. Rsp5: Mecanismo de regulación

En levadura, varios son los mecanismos que participan en la regulación de Rsp5. Además de la regulación por las proteínas adaptadoras, de las que hablaremos a continuación, recientemente se ha demostrado también que Rsp5 es fosforilado, aunque se desconoce la quinasa encargada de ello así como el mecanismo por el cual la función de Rsp5 se ve afectada (Sasaki and Takagi, 2013).

4.2.1. Fosforilación de Rsp5

En el modelo de regulación dependiente de fosforilación y por tanto de la actividad de Rsp5 de Sasaki y Takagi se propone que Rsp5 se inactiva por la fosforilación de la treonina 357 de su dominio WW2 (Figura 7). Algunos cambios ambientales como la fuente de nitrógeno inducen una transducción de señales que inhibe y/o activa una quinasa y/o fosfatasa desconocida que regula la actividad de Rsp5. El estímulo así como su ruta aguas abajo, son todavía desconocidos.

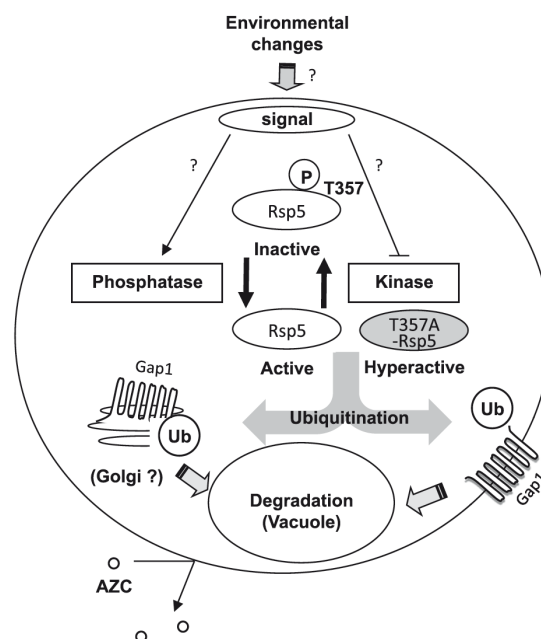


Figura 7. Modelo de regulación de la actividad de Rsp5 dependiente de fosforilación. La desfosforilación en la posición 357 causa un cambio conformacional en Rsp5 a su forma activa que reconoce y ubiquitina a su sustrato (Gap1) a nivel de Golgi y membrana plasmática. La variante que mimetiza la desfosforilación por un cambio de una treonina por una alanina (Rsp5-T357A) confiere tolerancia al AZC (análogo tóxico de la prolina). Esta variante activa de Rsp5 incrementa la ubiquitinación de la permeasa Gap1, que es posteriormente degradada en la vacuola. Una versión mutada de Rsp5 que mimetiza el efecto de la fosforilación al cambiar la treonina 357 por un ácido aspártico (Rsp5-T357D) es sensible a AZC. La sensibilidad a AZC sugiere que la forma fosforilada de Rsp5 consiste en un estado inactivo de Rsp5. Si Rps5 no puede mediar la internalización y posterior degradación de las permeasas responsables de la entrada de AZC, la célula será más sensible. En estas células Gap1 se localiza en la membrana plasmática en presencia de amonio como fuente de nitrógeno explicando la sensibilidad al AZC (Gap1 facilita su entrada) (Sasaki and Takagi, 2013).

4.2.2. Proteínas adaptadoras de Rsp5

Por otro lado, en el mecanismo implicado en la ubiquitinación de los transportadores de la membrana plasmática, poco se sabe acerca de los motivos estructurales que median el reconocimiento de los distintos sustratos por su específica ubiquitina ligasa. Se ha descrito que los dominios WW de Rsp5 interactúan con ciertos sustratos solubles de una forma dependiente de PPxY. Por otro lado, el número de sustratos de Rsp5 tanto de la membrana plasmática como del aparato de Golgi es inmenso, sin embargo, la mayoría no poseen motivos PPxY que permiten la interacción directa con los dominios WW de Rsp5. Uno de los escasos ejemplos es el del canal epitelial de Na⁺ de la membrana plasmática en mamíferos, ENaC, cuya regulación endocítica viene mediada por los motivos PY (PPxY) presentes en sus subunidades α , β y γ que interactúan directamente con los dominios WW de Nedd4-2, la E3 ubiquitina ligasa de tipo HECT homóloga a Rsp5 (Staub et al., 1996). A raíz de estos datos se sugirieron dos hipótesis. En primer lugar, la existencia de motivos (actualmente desconocidos) que estuvieran implicados en la interacción de Rsp5 vía sus dominios WW. Por otro lado que Rsp5 pudiera interactuar con sus sustratos de la membrana plasmática mediante proteínas adaptadoras. Esta última posibilidad parecía la más probable por el gran número de funciones de Rsp5, el gran número de compartimentos donde ejerce dichas funciones y el gran número de sustratos potenciales, especialmente en la ruta endocítica.

4.2.2.1. Adaptadores a nivel de la ruta endosomal

Se han caracterizado adaptadores de Rsp5 actuando en diferentes localizaciones subcelulares. Algunos de ellos actúan en la ruta endosomal y/o endocítica. Por ejemplo, Bsd2, está implicado en la clasificación en los MVB de algunos transportadores como Smf1 (Figura 3) (Liu et al., 1997). Éste posee motivos PY que permiten la interacción con los dominios WW de Rsp5 (Hetteima et al., 2004). Otras dos proteínas redundantes con motivos PY conocidas como Tre1/Tre2, asisten a Bsd2 en la conducción de Rsp5 hacia Smf1 en la ruta multivesicular (Stimpson et al., 2006). Bsd2 también ha sido identificado como necesario para el tráfico y ubiquitinación del precursor de membrana de la enzima lisosomal Phm5 (polifosfatasa). Sin embargo el par Tre1/Tre2 no es necesario en este caso (Hetteima et al., 2004). Parece obvio que no sólo son los adaptadores sino también su combinación lo que regula la ubiquitinación del *cargo* dependiente de Rsp5.

Otros adaptadores con motivos PY, como las proteínas homólogas Ear1 y Ssh4, también contribuyen a la ubiquitinación mediada por Rsp5 de determinados *cargos* transmembrana que se hallan en ruta desde el aparato de Golgi (TGN) hacia la vacuola, como son la permeasa general de aminoácidos Gap1 o el transportador de hierro Sit1,

pero no el de manganeso Smf1 (Leon et al., 2008). Curiosamente, aunque la ausencia del par de proteínas Ear1/Ssh4 previene la clasificación del transportador de uracilo Fur4 en los cuerpos multivesiculares, no influencia su ratio de internalización a nivel de la membrana plasmática. Parece probable que sucesivas ubiquitinaciones de un determinado *cargo* ocurren a lo largo de la ruta endocítica (en la membrana plasmática y luego en los MVB), bien bajo la acción de diferentes adaptadores o incluso también bajo la acción del mismo adaptador, como es el caso de la internalización inducida por glucosa del transportador de lactato Jen1 que viene mediada por el adaptador Rod1 (Art4), tanto a nivel de la membrana plasmática como a nivel del TGN (Becuwe and León, 2014).

4.2.2.2. Adaptadores a nivel de la membrana plasmática

Además de los adaptadores endosomales, otros adaptadores están involucrados en la ubiquitinación dependiente de Rsp5 de las proteínas de la membrana plasmática. Este proceso está regulado por la disponibilidad de nutrientes. El primer par de adaptadores identificados actuando a nivel de la membrana plasmática fue el de las proteínas con motivos PY, Bul1 y Bul2, necesarias para la ubiquitinación y consecuente internalización de la permeasa general de aminoácidos Gap1, en presencia de una fuente óptima de nitrógeno en el medio, así como la del transportador de cobre Ctr1 (Liu et al., 2007; Soetens et al., 2001).

Sin embargo, no estaba muy claro que estas proteínas estuvieran involucradas en el proceso de ubiquitinación y endocitosis de todos los sustratos de Rsp5; la delección de *BUL1* y *BUL2* protege el transportador Tat2 de la endocitosis mientras que la endocitosis de Tat1 no se evita con la delección de ninguno de estos dos genes (Abe and Iida, 2003).

En el año 2008, se descubrió una familia de proteínas dotada de una propiedad específica adaptadora, demostrando que el mecanismo adaptador es mucho más amplio de lo que previamente se pensaba. Lin y colaboradores identificaron una familia de proteínas que denominaron como “Adaptadores de Tráfico Relacionados con Arrestina” o ARTs (*Arrestin Related Trafficking adaptors*) que median la interacción entre la ubiquitina ligasa Rsp5 y los *cargos* de la membrana plasmática durante la endocitosis en la levadura *S. cerevisiae* (Lin et al., 2008).

En la tabla 1, se ilustran algunos ejemplos de proteínas transportadoras sujetas a este tipo de regulación endocítica dependiente de Rsp5. También se indica la proteína transportadora, las condiciones por las que se induce su endocitosis, así como la proteína adaptadora mediadora de dicha endocitosis.

Permease (substrate)	Conditions of vacuolar targeting	Adaptor(s)	Refs
Can1 (arginine)	Cycloheximide	Art1 ^a	[63]
Ctr1 (copper)	Substrate excess	Bul1 ^a , Bul2 ^a	[101]
Fur4 (uracil)	Cycloheximide	Bul1 ^a , Bul2 ^a , Art1 ^a , Art2 ^a , Art8 ^a , Bsd2 ^b , Ear1 ^b , Ssh4 ^b	[27,64,70,102]
	Substrate excess	Bul1 ^a , Bul2 ^a , Art1 ^a , Art2 ^a , Art8 ^a , Bsd2 ^b	
Gap1 (amino acids)	Ammonium or substrate excess	Bul1 ^{a,b} , Bul2 ^{a,b} , Ear1 ^b , Ssh4 ^b	[24,45,46,70]
Hxt6 (hexoses)	Cycloheximide	Art8 ^a	[64,103]
	Substrate excess	Art4 ^a	
Itr1 (inositol)	Substrate excess	Art5 ^a , Bsd2 ^b	[64]
Lyp1 (lysine)	Cycloheximide	Art2 ^a	[63,64]
	Substrate excess	Art1 ^a	
Mup1 (methionine)	Substrate excess	Art1 ^a	[63]
Sit1 (ferroxamines)	Absence of substrate	Ssh4 ^b , Ear1 ^b , Tre1 ^b , Tre2 ^b	[40,70]
Smf1 (manganese)	Substrate excess	Bsd2 ^b , Tre1 ^b , Tre2 ^b	[64,66,67,86]
	Stresses	Bsd2 ^b , Art2 ^a , Art8 ^a , Bsd2 ^b , Tre1 ^b , Tre2 ^b , Ear1 ^b , Ssh4 ^b	
Tat2 (tryptophan)	Cycloheximide	Bul1 ^{a,b} , Bul2 ^{a,b} , Art2 ^a , Art8 ^a , Bsd2 ^b	[44,47,64]
	Substrate excess	Bul1 ^{a,b} , Bul2 ^{a,b} , Art1 ^a , Art2 ^a , Art8 ^a , Bsd2 ^b	

Tabla 1. Ejemplos de permeasas en levadura sujetas a la degradación vacuolar dependiente de Rsp5. (a) Adaptadores de Rsp5 actuando a nivel de la membrana plasmática. (b) Adaptadores de Rsp5 actuando a nivel de Golgi-endosoma. La posición de las lisinas ubiquitinadas se encuentra disponible en la base de datos de las proteínas de transporte de levadura *Yeast Transport Protein database* (<http://homes.esat.kuleuven.be/ytpdb/>) (Lauwers et al., 2010).

5. La familia de proteínas ARTs

5.1. Características estructurales y funcionales de la familia de proteínas ARTs

Art1 (Ldb19) fue el primer miembro de la familia ARTs identificado como un regulador de la endocitosis específica de *cargos* de la membrana plasmática. Esta identificación estableció la hipótesis de que el genoma de levadura debía codificar para otras proteínas similares que regularan también la endocitosis de *cargos* específicos.

Usando la herramienta de búsqueda y alineamiento de motivos (MAST), se identificaron ocho proteínas más, además de Art1 (Ldb19). Estas nueve secuencias poseían una longitud comprendida entre los 500 y 1200 aminoácidos. En todas ellas, excepto para Art2 (Ecm21) y Art8 (Csr2), se predijo la presencia de un dominio de plegamiento o *fold* de tipo arrestina en la parte N-terminal. Además, cada una de las secuencias contenían motivos PY en su extremo C-terminal sugiriendo que podían actuar como adaptadores de la ubiquitina ligasa Rsp5 (Lin et al., 2008). En la figura 8 se muestra un esquema de los resultados de este alineamiento.

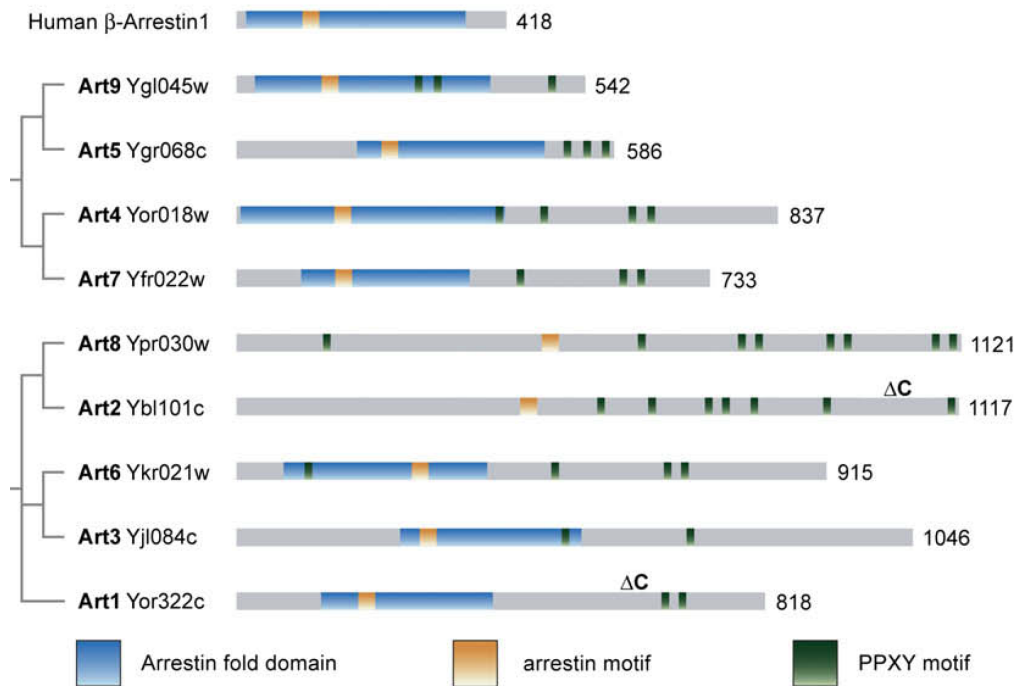


Figura 8. Miembros de la familia de proteínas ARTs en levadura. Se ha ilustrado el motivo de arrestina, el dominio de plegamiento de arrestina (en la zona N-terminal) y los motivos PY. El árbol muestra la relación entre los ARTs basada en la similitud de su secuencia. En la figura se indican los nombres sistemáticos y el alias con la nomenclatura ARTs de cada uno de los genes (Lin et al., 2008).

Posteriormente, en este mismo trabajo, se comprobó que todas las proteínas ARTs, exceptuando Art9, tenían cierta capacidad para unirse a los dominios WW de Rsp5. Por tanto, todos estos datos sugieren que otros miembros de la familia ARTs, además de Art1 (Ldb19), regulan la ubiquitinación mediado por Rps5 y posterior endocitosis de proteínas específicas de la membrana plasmática.

El nombre recibido por esta familia “Adaptadores de Tráfico Relacionados con Arrestina” (ARTs), es debido a las similitudes tanto estructurales como funcionales con las arrestinas de eucariotas superiores. Las arrestinas, son adaptadores que dirigen el tráfico de *cargos* específicos en respuesta a señales del entorno. Los miembros de la familia arrestina contienen motivos de plegamiento de tipo arrestina muy conservados y pueden dividirse en los tipos α y β arrestinas, en función de su secuencia primaria y características estructurales (Alvarez, 2008). Mientras que se conoce desde hace ya varios años que las β -arrestinas regulan la endocitosis de varias clases de receptores en mamíferos (Lefkowitz et al., 2006), de momento sólo se ha demostrado la función en el tráfico para una de las seis α -arrestinas de mamíferos, TNXIP (Wu et al., 2013). Estas α -arrestinas poseen los motivos PY de unión a los dominios WW (Patwari and Lee, 2012). Dichas similitudes sugieren que la familia de proteínas ARTs podría funcionar como un sistema de control de calidad en la membrana plasmática mediando la ubiquitinación que marca las proteínas para su posterior degradación en la vacuola. Así, los ARTs podrían participar en la remodelación de las proteínas de la

superficie celular en respuesta a cambios ambientales. Recientemente, también se ha propuesto a las proteínas Bul1 y Bul2 como adaptadores de tipo arrestina. Estas también presentan en sus secuencia el motivo arrestina además de los dominios PY, ambos imprescindibles para la ubiquitinación y posterior degradación de la permeasa general de aminoácidos Gap1 (Merhi and André, 2012).

Cabe destacar que estos miembros de la familia ARTs, además de su nombre sistemático y su alias, que vienen descritos en la figura 8, también poseen un nombre estándar: Ldb19 (Art1), Ecm21 (Art2), Aly2 (Art3), Rod1 (Art4), Art5 (Art5), Aly1 (Art6), Rog3 (Art7), Csr2 (Art8) y Rim8 (Art9). En este trabajo nos referiremos a estas proteínas con sus alias "Artx".

5.2. Modo de acción de la familia de proteínas ARTs

Aunque la familia de proteínas ARTs proporciona, a modo general, una unión física entre Rsp5 y su *cargo*, estudios experimentales de diversos autores han demostrado ciertas características adicionales sobre su modo de acción. Los ARTs median la asociación de Rsp5 con determinados *cargos* a través de sus motivos PY. Esta unión se produce específicamente en respuesta a ciertos estímulos (Lin et al., 2008). Otros estudios confirman que, además, los ARTs son necesarios para dirigir a Rsp5 hacia la membrana plasmática (Belgareh-Touze et al., 2008; O'Donnell et al., 2010). Otro aspecto del proceso de endocitosis mediado por los ARTs es la necesidad de ser ubiquitinados por Rsp5 para poder ejercer su función (Figura 9) (Lin et al., 2008). Estos investigadores observaron que la ubiquitinación del adaptador es necesaria para la correcta localización de los ARTs. Una versión no ubiquitinable del adaptador Art1 no es capaz de mediar la endocitosis de la permeasa de arginina Can1 en respuesta a determinados estímulos, aunque el mecanismo que lo sustenta todavía no ha sido caracterizado (Lin et al., 2008). De manera interesante otros autores identificaron a las proteínas Art2 y Art8 como sustratos de Rsp5, así como también de su enzima de desubiquitinación Ubp2, sugiriendo que la función de los adaptadores puede ser modulada por rondas de ubiquitinación y desubiquitinación, contribuyendo a la complejidad de esta regulación (Kee et al., 2006). Por otro lado, algunos miembros de la familia ARTs (también los adaptadores endosomales Bsd2, Tre1/Tre2 y Ear1/Ssh4), ubiquitinados por Rsp5 al ejercer su acción adaptadora, son también reconocidos como *cargos* y destinados a la vacuola para su degradación (Lin et al., 2008). De esta forma, el hecho de que Rsp5 sea responsable de la ubiquitinación tanto del adaptador como de su *cargo* sugiere la existencia de un bucle de retroalimentación en la endocitosis regulada por los ARTs.

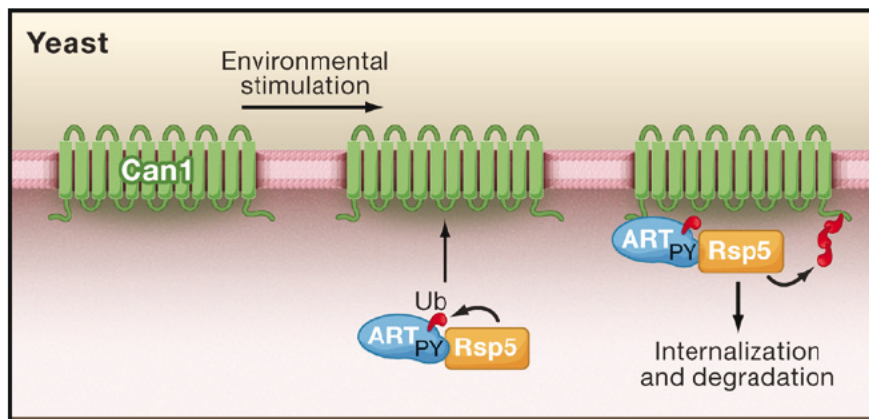


Figura 9. Endocitosis de *cargos* mediada por los ARTs. En levadura, los Adaptadores de Tráfico Relacionados con Arrestina (ARTs) y la E3 Ubiquitina ligasa Rsp5 son reclutados en la membrana plasmática en respuesta a distintos estímulos ambientales que desencadenan la endocitosis de proteínas como permeasas y transportadores (por ejemplo la del transportador de arginina Can1). A través de sus motivos PY, los ARTs se unen a Rsp5 y median la ubiquitinación (en rojo) del *cargo* (Can1). Posteriormente el *cargo* ubiquitinado es internalizado y degradado. Los ARTs son también ubiquitinados por Rsp5, evento requerido para la endocitosis en al menos algunos casos (Polo and Di Fiore, 2008).

Otra de las características más importantes de los ARTs consiste en que confieren especificidad a Rsp5 durante su reconocimiento del *cargo*. Una proteína ARTs puede mediar la endocitosis de diferentes *cargos* de la membrana plasmática. Art1, por ejemplo, es necesario para mediar la endocitosis de al menos las tres proteínas de la membrana plasmática Can1, Mup1 y Lyp1, pero no de algunas otras como Ftr1 y Pdr5 (Mittal and McMahon, 2009). Art5 media la endocitosis del transportador de inositol Itr1 y Hxt6 (transportador de hexosa de alta afinidad) requiere de los adaptadores Art4 y Art8 (Nikko and Pelham, 2009). En este mismo trabajo se describe que tanto la permeasa de uracilo Fur4 como el transportador de triptófano Tat2 son regulados por diversos adaptadores entre los que se encuentran Art1, Art2 y Art8, por lo que es evidente que otra característica de los ARTs es su promiscuidad, solapándose con sus *cargos*. Es posible que exista redundancia entre los adaptadores de Rsp5. Algunos ejemplos adicionales de redundancia de función se ilustran con los pares de adaptadores de la membrana plasmática Art3/Art6, Art2/Art8 o de Art1/Art4/Art7 (Alvaro et al., 2014; Nikko et al., 2008; O'Donnell et al., 2010; O'Donnell et al., 2013). Recordemos que esta redundancia también se ha observado en algunos pares de adaptadores de la ruta endosomal Tre1/Tre2, Ear1/Ssh4 y Bul1/ Bul2 (Belgareh-Touze et al., 2008; Kota et al., 2007; Soetens et al., 2001; Yashiroda et al., 1998). Además, en determinados casos se requiere cooperación entre este tipo de proteínas, como se demostró en los adaptadores Bsd2 y Tre1/Tre2 (Belgareh-Touze et al., 2008).

Por otra parte, como ya hemos comentado, el reconocimiento del *cargo* depende del tipo de estímulo. Así el transportador de lisina Lyp1 requiere Art1 para su endocitosis ante un estímulo de lisina y Art2 en presencia de cicloheximida en el medio (Lin et al.,

2008). La endocitosis de Dip5, un transportador de ácido aspártico y glutámico, se desencadena a partir del reclutamiento de Rsp5 por parte de las proteínas Art3 y Art6, especialmente ante un exceso de ácido aspártico en el medio (Hatakeyama et al., 2010; O'Donnell et al., 2013).

También se ha sugerido un papel diferente al de la endocitosis para estas proteínas adaptadoras. Los adaptadores Art3 y Art6 regulan, mediante su asociación a proteínas señalizadoras, el reciclaje de la permeasa general de aminoácidos Gap1 desde los endosomas hacia la red del trans-Golgi (*Trans Golgi Network* o TGN) y/o la membrana plasmática (Figura 10). La salida de vesículas de Gap1 del endosoma hacia el TGN o directamente hacia la membrana plasmática que tiene lugar a través de Art3 está regulada entre otras por la quinasa Npr1 (*Nitrogen permease reactivator*), mientras que las rutas de tráfico de Gap1 mediadas por Art6, todavía están siendo caracterizadas (O'Donnell et al., 2010).

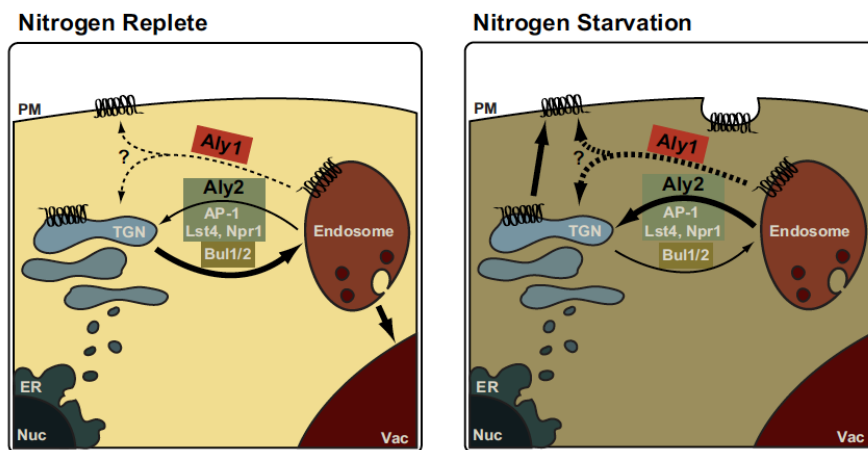


Figura 10. Modelo de regulación por nutrientes del tráfico de Gap1 dependiente de las proteínas Art3 y Art6. Bajo condiciones óptimas de nitrógeno, la mayoría de Gap1 circula desde el TGN hacia los endosomas/vacuolas sin pasar por la membrana plasmática. El tráfico de Gap1 endosomal dependiente de Art3 y Art6 se ve reducido. En estas condiciones la quinasa Npr1 está inactiva. Bajo condiciones de ayuno de nitrógeno, la permeasa Gap1 de nueva síntesis se desplaza desde el TGN hacia la membrana plasmática, y el reciclaje de Gap1 desde los compartimentos endosomales se induce. Npr1 está activo. Art3 y Art6 median el tráfico de Gap1 desde los compartimentos endosomales de vuelta al TGN o a la membrana plasmática a través de dos rutas distintas. Art3 requiere AP-1, Lst4 y Npr1 para mediar el reciclaje de Gap1. Se propone que opera en el tráfico desde los endosomas al TGN. Art6 funciona independientemente de los factores de reciclaje conocidos y debe regular el reciclaje de Gap1 desde los endosomas a través de múltiples vías que se dirigen al TGN y/o directamente de vuelta a la membrana plasmática. Las líneas negras indican las vías del tráfico de Gap1. Las líneas más gruesas indican las vías predominantes en dicha condición de nutrientes (O'Donnell et al., 2010).

Todos estos datos indican que ni el adaptador ni el *cargo* por si solos determinan la especificidad de la unión. De hecho, la especificidad debe ser mediada, al menos en parte, por la regulación de la interacción adaptador-*cargo*. Aunque tampoco pueden excluirse otros mecanismos.

En la figura 11 se muestra un resumen de la función de algunos miembros identificados en esta familia de adaptadores ARTs.

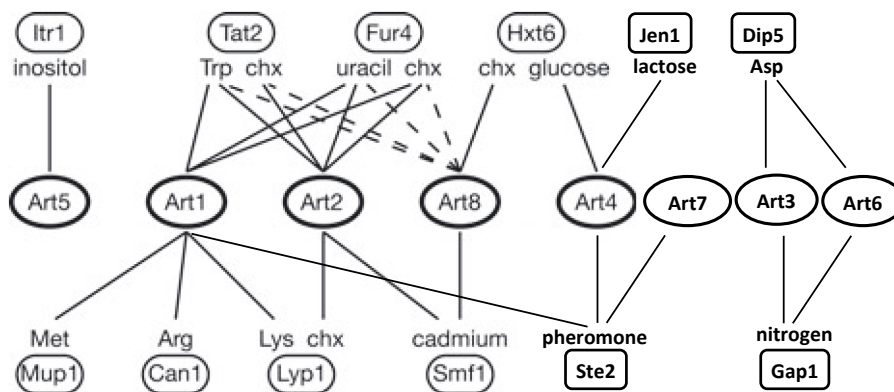


Figura 11. Resumen de las funciones de los adaptadores "ARTs". Los adaptadores de la familia ARTs se representan en la línea del centro, los transportadores en la línea superior o inferior. Los distintos componentes empleados para inducir la endocitosis vienen indicados (chx, cicloheximida, Trp, triptófano, Met, metionina, Arg, arginina, Lys, lisina, Asp, ácido aspártico). Las líneas continuas indican las funciones de una arrestina en particular con el transportador indicado y la condición inductora. Las líneas discontinuas indican una actividad débil (Adaptado de Nikko and Pelham, 2009).

La información disponible sugiere que la combinación de la acción de diferentes conjuntos de adaptadores es necesaria para guiar las ubiquitina ligasas E3 hacia sus *cargos* específicos. En mamíferos, varios son los estudios que demuestran que las α -arrestinas pueden unirse a las β -arrestinas, apoyando también que estas proteínas pueden actuar de manera coordinada para regular la composición de las proteínas de membrana presentes en la superficie celular (Alvarez, 2008; Shea et al., 2012). Este potencial de los adaptadores para trabajar en combinación podría resolver el interrogante de la existencia de las pocas E3 ubiquitina ligasas en relación a los sustratos ubiquitinados; hay sólo unas pocas docenas de E3s en levadura para cerca de 1000 sustratos conocidos (Peng et al., 2003). La cooperación de los adaptadores con las enzimas E3s podría conferir de capacidad combinatoria suficiente para enfrentarse al gran número de sustratos.

5.3. Regulación de la interacción transportador-adaptador-Rsp5: modificaciones post-traduccionales y rutas de señalización

Pese a todo este conocimiento respecto a la maquinaria endocítica y su modo de regulación y aunque en algunos casos ha sido demostrada la interacción directa entre las permeasas y sus adaptadores, el modo de reconocimiento de la proteína diana y como se regula la interacción *cargo*-adaptador-Rsp5 de acuerdo a las condiciones de crecimiento, está todavía por resolver (Leon and Haguenaer-Tsapis, 2009; Lin et al., 2008; Nikko et al., 2008; Sullivan et al., 2007). Modificaciones post-traduccionales específicas de los *cargos* dependientes del estímulo o modificaciones post-

traduccionales de los propios ARTs son los principales sospechosos de mediar esta regulación.

Además de la ubiquitinación por Rsp5, algunas investigaciones recientes han comenzado a definir otros mecanismos de regulación post-traduccionales tanto de los *cargos* como de las proteínas adaptadoras de Rsp5.

En el caso de las proteínas diana a ubiquitinar, se ha observado que, a menudo, para que tenga lugar la ubiquitinación por Rsp5 del *cargo* es necesaria una previa fosforilación del sustrato. En consecuencia, la presencia de grupos fosfatos en las proteínas diana puede contribuir a su reconocimiento por las proteínas adaptadoras (Belgareh-Touzé et al., 2008; Hicke and Riezman, 1996; Kelm et al., 2004; Nikko et al., 2008). Por ejemplo, Art2 y Art8, median la ubiquitinación y endocitosis del transportador Smf1, y la fosforilación de este *cargo* es necesaria para la unión con Art2 (Nikko et al., 2008). Recientemente también se ha observado que el receptor factor α de la feromona Ste2 requiere una fosforilación previa a su ubiquitinación por las proteínas quinasas Yck1 y Yck2 (Alvarez et al., 2014). Además, experimentos con permeasas quiméricas han demostrado que los determinantes para la unión del adaptador ARTs se hallan en la cola citosólica del extremo N-terminal de las permeasas Can1 y Lyp1 (Lin et al., 2008).

Respecto a la regulación de los adaptadores, análisis proteómicos de fosforilación en levadura han demostrado que los miembros de la familia ARTs son extensivamente fosforilados (Albuquerque et al., 2008). También se ha demostrado que el miembro fundador de la familia ARTs, Art1, es fosfoinhibido por la quinasa de la ruta TOR Npr1 (MacGurn et al., 2011). La fosforilación de Art1 en múltiples sitios disminuye su asociación con la membrana plasmática y por tanto disminuye la ubiquitinación dependiente de Rsp5 de las proteínas diana (como la permeasa de arginina Can1). De forma similar, la quinasa Npr1 fosforila los adaptadores de Rsp5, Bul1 y Bul2 (Merhi and Andre, 2012). Esta fosforilación también inhibe la acción de estos adaptadores, aunque en este caso creando sitios de unión para las proteínas 14-3-3. Esta asociación de Bul1 y Bul2 con la proteína 14-3-3 previene la ubiquitinación de Gap1 por Rsp5 (Merhi and Andre, 2012). De forma diferente, Npr1 fosforila al adaptador Art3, activando en este caso su función en el tráfico de Gap1 hacia la membrana plasmática (O'Donnell et al., 2010). Se ha demostrado que otro miembro de la familia ARTs, Art4, también es inhibido por 14-3-3, pero en este caso la fosforilación es llevada a cabo por la quinasa Snf1 y su transportador es la permeasa de lactato Jen1 (Becuwe et al., 2012). Recientemente también se ha observado que tres miembros de la familia ARTs (Art1, Art4 y Art7) participan en la endocitosis y consiguiente internalización de Ste2, y es probable que cada ART actúe bajo condiciones diferentes (Alvaro et al., 2014). En este proceso, Art4, requiere una desfosforilación dependiente de calcineurina para

activarse (Alvaro et al., 2014). La desfosforilación dependiente de calcineurina del adaptador Art6 también es necesaria para el tráfico de Dip5 a la vacuola, sin embargo, esta desfosforilación de Art6 no regula su papel con Gap1 (O'Donnell et al., 2013). Este resultado vuelve a sugerir que la fosforilación podría inhibir la función en el tráfico vacuolar de algunos adaptadores.

Aunque la misma maquinaria parece estar implicada en el tráfico de membrana y en la degradación de la mayoría de transportadores (la ubiquitina ligasa Rsp5, maquinaria *ESCRT*, adaptadores de Rsp5 etc.), las condiciones fisiológicas que inducen la degradación o estabilización de estos transportadores difieren mucho dependiendo del transportador. Incluso proteínas transportadoras que pertenecen a la misma familia pueden presentar diferencias radicales en su perfil de regulación. Esto plantea la pregunta de cómo se consigue este control específico de los transportadores a nivel de tráfico de la membrana. Numerosos ejemplos, citados en esta Introducción, indican que el reconocimiento del sustrato y modificaciones post-traduccionales como la fosforilación mediada por proteínas quinasas (como Npr1) son los principales componentes que determinan el destino de un transportador. A su vez, estos mecanismos que parecen determinar la composición de la membrana plasmática, implican diferentes rutas de señalización que se solapan, entre las que destaca una ruta fundamental para el crecimiento celular en levadura conocida como la ruta TOR.

6. La ruta de señalización TOR (*Target of Rapamycin*)

TOR (*Target Of Rapamycin*) o diana de la rapamicina, es una Serina/Treonina quinasa perteneciente a la familia de las fosfatidilinositol quinasas, una familia altamente conservada desde levaduras hasta mamíferos. Esta proteína TOR es importante para las células ya que funciona como un regulador central del crecimiento celular. A su vez, esta quinasa está regulada por una amplia variedad de señales que incluyen factores de crecimiento, nutrientes y condiciones de estrés.

6.1. La rapamicina y su mecanismo de acción

La rapamicina es un macrólido lipofítico y un metabolito secundario natural producido por *Streptomyces hygroscopicus*, una bacteria aislada de muestras de suelo de la Isla de Pascua (localmente Rapa Nui). Descubierta inicialmente por su poder antibiótico, posteriormente también se observó que poseía actividad inmunosupresora, capacidad de bloquear el crecimiento y proliferación de las células T, así como propiedades anticancerígenas (Guba et al., 2002; Hidalgo and Rowinsky, 2000; Hosoi et al., 1998; Schreiber, 1992).

Una serie de observaciones experimentales llevaron a la elaboración de un posible modelo sobre su mecanismo de acción. Este modelo establece que la rapamicina se une con alta afinidad a la proteína FKBP12, codificada en levadura por el gen *FPR1*, de forma que el complejo FKBP12-rapamicina se une a su vez al dominio N-terminal FRB de la quinasa TOR (Figura 12)(Choi et al., 1996; Lorenz and Heitman, 1995). De forma simultánea, la rapamicina ocupa el bolsillo de unión hidrofóbico de FKBP12 y el bolsillo de unión hidrofóbico del dominio FRB uniendo a FKBP12 y TOR. Estas interacciones proteína-proteína entre FKBP12-rapamicina y TOR podrían explicar porque la rapamicina por sí sola no puede interaccionar con TOR; sin embargo el mecanismo por el cual FKBP12-rapamicina inhibe la funcionalidad de TOR se desconoce. El complejo FKBP12-rapamicina debe inhibir la actividad quinasa de TOR o bien directamente o bien bloqueando el acceso a sus sustratos o proteínas accesorias (Crespo and Hall, 2002; Loewith and Hall, 2011).

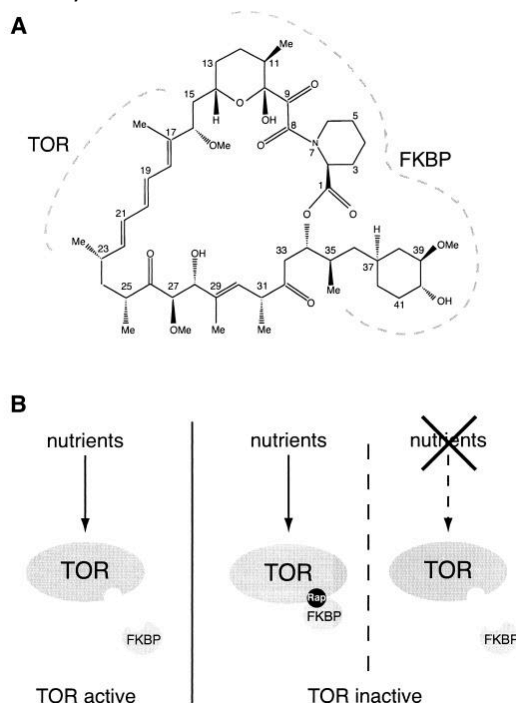


Figura 12. El complejo FKBP-rapamicina se une e inhibe a TOR. (A) Estructura química de la rapamicina. Las regiones de interacción de la rapamicina con TOR y FKBP se indican con líneas discontinuas. (B) TOR está activo en presencia de nutrientes e inactivo tras una condición de ayuno de nutrientes o de unión con FKBP-rapamicina (Rap) (Crespo and Hall, 2002).

6.2. Estructura de la proteína quinasa TOR

Tras la identificación original de TOR en la levadura *S. cerevisiae*, TOR también fue identificado en hongos, mamíferos, gusanos y plantas, sugiriendo que TOR está conservado en todas las formas de vida eucariota tanto a nivel estructural como por ser diana del complejo FKBP-rapamicina (Schmelzle and Hall, 2000).

Todos los “TORs” poseen una estructura similar. Los dominios identificados en TOR (en orden desde el extremo N-terminal al extremo C-terminal) son las llamadas repeticiones de tipo HEAT, el dominio FAT, el dominio FRB, el dominio quinasa y el dominio FACT (Figura 13)(Schmelzle et al., 2002). El dominio FRB (≈ 100 residuos), como ya se ha mencionado previamente, es la región de unión con el complejo FKBP-rapamicina. Todas las mutaciones en los genes *TOR* que confieren resistencia a la rapamicina coinciden en que presentan alguna mutación en su dominio FRB, directamente previniendo la unión del complejo FKBP-rapamicina e impidiendo afectar la actividad de TOR (Cafferkey et al., 1993; Chen et al., 1995; Heitman et al., 1991a; Helliwell et al., 1994; Lorenz and Heitman, 1995; Stan et al., 1994). Sin embargo, existe una principal diferencia en *S. cerevisiae*, ya que este organismo modelo posee inusualmente dos genes TOR, mientras que el resto de eucariotas poseen uno sólo.

6.3. Funciones celulares de la proteína quinasa TOR en *S. cerevisiae*

TOR1 y TOR2 juegan un papel central en el control del crecimiento celular como parte de una ruta separada en dos ramas de señalización. Aunque son estructuralmente similares, TOR1 y TOR2 no son funcionalmente idénticos (Helliwell et al., 1994; Kunz et al., 1993). TOR2 tiene una función redundante con TOR1 y otra función única (Hall, 1996; Helliwell et al., 1998a).

La rama de señalización común de la ruta TOR se compone de varias vías efectoras que controlan una amplia variedad de parámetros que en conjunto determinan la masa celular; se considera que controla el crecimiento celular en el tiempo. Mientras que la rama mediada únicamente por TOR2, controla espacialmente el crecimiento celular. De esta forma estas dos ramas separadas de la ruta TOR integran el control en el tiempo y en el espacio del crecimiento celular (Crespo and Hall, 2002; Loewith and Hall, 2011).

6.4. Complejos multiproteicos de la proteína quinasa TOR: TORC1 y TORC2 en *S. cerevisiae*

En la investigación sobre la ruta TOR, se han identificado dos complejos multiproteicos conocidos como complejo TOR1 (TORC1) y complejo TOR2 (TORC2) (Figura 13) (Loewith et al., 2002; Wedaman et al., 2003; Wullschleger et al., 2006). Estos dos complejos son estructural y funcionalmente distintos, y ambos complejos se corresponden a las dos ramas de señalización de la ruta TOR.

TORC1, contiene a TOR1 o a TOR2, es sensible a rapamicina (es inhibido por el complejo FKBP-rapamicina) y media la rama de señalización compartida. Los parámetros que controla esta rama incluyen la síntesis y degradación de proteínas,

síntesis y degradación de RNAm, biogénesis de ribosomas, transporte de nutrientes y la autofagia (secuestro al azar de porciones del citoplasma cuyo destino es la vacuola) (De Virgilio and Loewith, 2006). Cuando las condiciones de crecimiento son favorables, TOR está activo y las células de levadura mantienen un buen ratio de biogénesis de ribosomas, inicio de la traducción e importe de nutrientes. Sin embargo, células de levadura tratadas con rapamicina, en condiciones limitantes de nitrógeno o carbono o sometidas a estrés, reprimen dramáticamente la síntesis de proteínas, inducen la autofagia y activan algunos factores de transcripción que responden a estrés. Por lo tanto, cuando las condiciones de crecimiento lo permiten, esta rama de la ruta de señalización TOR induce los procesos anabólicos en detrimento de los procesos catabólicos (Crespo and Hall, 2002; De Virgilio and Loewith, 2006; Loewith and Hall, 2011; Wullschleger et al., 2006).

El complejo TORC1 consiste en Kog1, Lst8, Tco89 y TOR1 o TOR2 (Loewith et al., 2002; Reinke et al., 2004), y se ha demostrado que se concentra en el límite con la membrana vacuolar (Binda et al., 2009; Urban et al., 2007). Además, esta localización vacuolar del complejo TORC1 parece ser constitutiva (Binda et al., 2009). Esto parece lógico teniendo en cuenta el hecho de que las vacuolas de levadura son los mayores reservorios de nutrientes y que la ruta de señalización TORC1 responde a señales de nutrientes.

El complejo TOR2 (TORC2), sin embargo, sólo contiene a TOR2 junto con las proteínas Avo1, Avo2, Avo3, Bit61 (y/o su parólogo Bit2) y Lst8 (Figura 13) (Loewith et al., 2002; Wedaman et al., 2003). Este complejo es insensible a rapamicina puesto que el complejo FKBP-rapamicina sólo se une a TOR en TORC1. Presumiblemente esta unión selectiva del complejo FKBP-rapamicina es debida a que Avo1 estaría enmascarando el dominio FRB de TOR2 en el complejo TORC2 (Loewith et al., 2002). Este complejo media la rama de la ruta de señalización única a TOR2. TOR2, pero no TOR1, funciona regulando los aspectos espaciales del crecimiento celular en levadura, como la organización polarizada del citoesqueleto de actina (favorece el tráfico de macromoléculas de la célula madre a la yema), la endocitosis y la síntesis de esfingolípidos (Loewith et al., 2002). Por otro lado, estudios de la localización subcelular del complejo TORC2, consideran que la vasta mayoría de TOR2 (aproximadamente el 90%), se halla en el complejo TORC2 (vs TORC1) y que éste complejo TORC2 está en o cerca de la membrana plasmática y en unos nuevos compartimentos de la membrana que nombraron como “compartimento de la membrana que contiene a TORC2” (MCT) (Berchtold and Walther, 2009). Por lo tanto, parece que TORC2 se encuentra en múltiples localizaciones subcelulares, la membrana plasmática y uno o posiblemente más sitios. La localización en la membrana, además de ser consistente con el papel de TORC2 en el control el citoesqueleto de actina y la endocitosis, es esencial para su viabilidad (Berchtold and Walther, 2009).

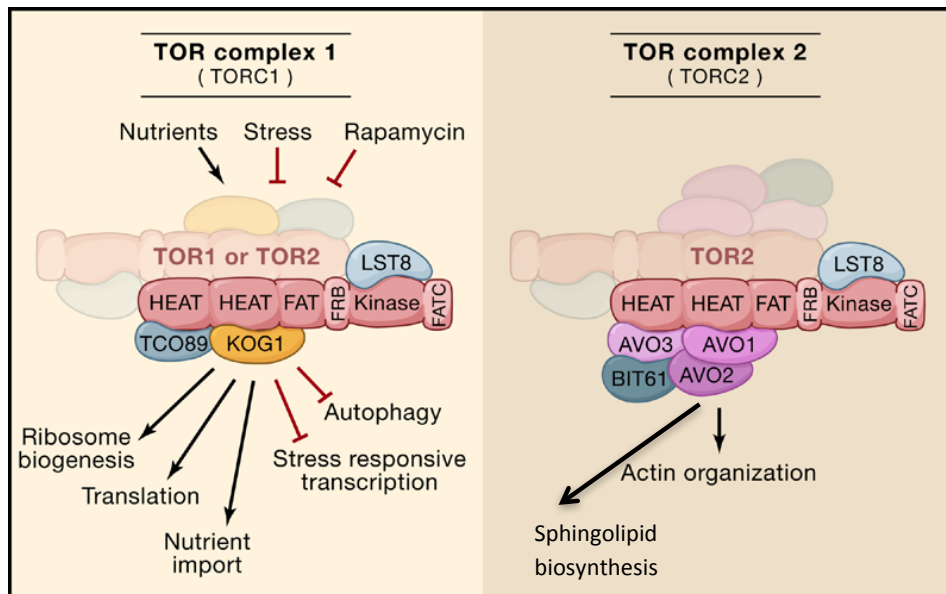


Figura 13. Complejo TOR1 (TORC1) y complejo TOR2 (TORC2) de *S. cerevisiae*. En la figura se indican las proteínas asociadas a TOR (KOG1, TCO89, LST8, AVO1–3 y BIT61) y los dominios encontrados en TOR (HEAT, FAT, FRB, quinasa y FATC). Ambos, TORC1 y TORC2 son multímeros, probablemente dímeros. El complejo TORC1 media la rama de señalización sensible a rapamicina que acopla las señales de crecimiento a la acumulación de masa. Los estímulos que regulan positivamente TORC1 y los procesos regulados por TORC1 que promueven la acumulación de masa se indican con flechas negras. Las señales que regulan negativamente TORC1, como el estrés o las condiciones de ayuno y que inducen procesos regulados negativamente por TORC1 se indican con flechas rojas. La rama de señalización de TORC2 es insensible a rapamicina y se requiere para la organización del citoesqueleto de actina y la síntesis de esfingolípidos (Adaptado de Wullschleger et al., 2006).

6.5. Señalización del Complejo TOR1 (TORC1)

El complejo quinasa multiproteico TORC1, como ya se ha comentado previamente, es un sensor de varias señales celulares y ambientales que incluyen la abundancia y calidad de nutrientes, el estatus energético y las señales de crecimiento. Responde coordinando actividades asociadas con el crecimiento y la proliferación celular. (Loewith and Hall, 2011).

Algunas condiciones fisiológicas como un ayuno de carbono o nitrógeno (o un ayuno inducido por rapamicina) o un estrés osmótico, redox o térmico, se ha descrito que originan una reducción de la actividad de TORC1 (Tate and Cooper, 2013; Urban et al., 2007). También las condiciones que inducen un mal plegamiento proteico alteran la actividad de dicho complejo, aunque los detalles del mecanismo por el que se lleva a cabo no se conocen completamente (Qian et al., 2010).

TORC1, es sensor y también responde específicamente a la disponibilidad de aminoácidos intracelulares. En levadura, parece que la actividad de TORC1 es especialmente sensible a leucina y glutamina (Binda et al., 2009; Cohen and Hall, 2009;

Crespo and Hall, 2002; Crespo et al., 2002). Un ayuno de leucina causa una reducción de la actividad de TORC1 y consecuentemente reduce la fosforilación de su sustrato Sch9 (Binda et al., 2009), mientras que un ayuno de glutamina activa los factores de transcripción Gln3, Rtg1 y Rtg3 induciendo la expresión de genes relacionados con la síntesis de glutamina (Crespo et al., 2002). También TORC1 responde a un ayuno de fosfato (Urban et al., 2007). Sin embargo, cabe destacar que poco se conoce acerca de los efectos en la actividad de TORC1 de cationes intracelulares como el K^+ , un catión esencial para el crecimiento y desarrollo celular y que se encuentra abundantemente representado en el interior celular. Será descrito en futuros apartados.

Otro ejemplo de que TORC1 responde a señales intracelulares, es la inhibición de la traducción con el compuesto cicloheximida el cual causa un aumento pronunciado de la actividad de TORC1 presumiblemente por el hecho de que desencadena un incremento de la concentración de aminoácidos libres en el citoplasma (Binda et al., 2009; Urban et al., 2007). Consecuentemente, un TORC1 activo controla el crecimiento vía fosforilación de sus dos principales ramas de efectores aguas abajo: la proteína quinasa Sch9 y el complejo Tap42-fosfatasa (Di Como and Arndt, 1996; Urban et al., 2007).

6.5.1. Quinasa Sch9 como sustrato del complejo TOR1 (TORC1)

La quinasa Sch9 de la familia AGC fue descubierta como un sustrato del complejo TOR1 (TORC1) (Powers, 2007). Esta quinasa, es un efector de TORC1 requerido, entre otras funciones, en la regulación de la biogénesis de ribosomas, el inicio de la traducción y la entrada en la fase G_0 del ciclo celular. Seis aminoácidos (T737, T723, S726, S758, S765 y S711) en el extremo C-terminal de Sch9 son directamente fosforilados por TORC1. La fosforilación de estos seis residuos es sensible a rapamicina, así como también a fuentes de nitrógeno o carbono limitantes. También tras condiciones de estrés osmótico, oxidativo o térmico, ésta se ve reducida transitoriamente (Urban et al., 2007). Así pues, la fosforilación dependiente de TORC1 es necesaria para la actividad de Sch9. Por otro lado, Sch9 no está implicado en regular la expresión de los genes dependientes del factor de transcripción Gln3, papel del otro efector de la ruta TORC1 conocido como complejo Tap42-fosfatasa (Urban et al., 2007).

6.5.2. Complejo Tap42-fosfatasa como sustrato del complejo TOR1 (TORC1)

En levadura, la calidad y la disponibilidad de fuentes de nitrógeno controla la expresión de genes que codifican proteínas necesarias para la toma y asimilación de compuestos nitrogenados. Este proceso regulatorio viene mediado por cuatro factores de transcripción de la familia GATA: los activadores Gln3 y Gat1/Nil1 y los represores Dal80 y Deh1/Gzf3 (Beck and Hall, 1999; Magasanik and Kaiser, 2002). De estos cuatro,

Gln3 es el activador principal de los genes regulados por nitrógeno. El complejo TORC1 regula este proceso a través de Tap42 que forma complejos con proteínas fosfatasa, como se detalla a continuación (Beck and Hall, 1999).

Tap42 es una proteína conservada que interacciona con las subunidades catalíticas de las fosfatasa de tipo 2A (PP2Ac), Pph21 y Pph22 y algunas fosfatasa relacionadas con la familia 2A como Sit4, formando los complejos Tap42-PP2A y Tap42-Sit4, respectivamente (Di Como and Arndt, 1996; Wang et al., 2003). La interacción de Tap42 con las fosfatasa Sit4, Pph21 y Pph22 es un proceso dinámico que viene regulado por la disponibilidad de nutrientes. Como se indica en la figura 14, en células creciendo en un medio rico en nutrientes, la fosforilación dependiente de TORC1 promueve la interacción de Tap42 con las fosfatasa (Di Como and Arndt, 1996; Jiang and Broach, 1999; Wang et al., 2003). Tap42 fosforilado está asociado con las fosfatasa formando un complejo que las inactiva o al menos restringe su reconocimiento del sustrato. En células creciendo en condiciones pobres en nutrientes o tratadas con rapamicina (TORC1 inactivo), Tap42 es desfosforilado disociándose del complejo con las fosfatasa y liberando a Sit4 (Beck and Hall 1999; Di Como and Arndt, 1996). Esta disociación de las fosfatasa del complejo con Tap42 viene acompañada por la desfosforilación de varios efectores aguas abajo, dianas también de la ruta de señalización TORC1, como Ure2, Gln3 o Npr1, indicando que la liberación de las fosfatasa del complejo con Tap42 causaría su activación (Beck and Hall, 1999; Cardenas et al., 1999; Schmidt et al., 1998).

Como TORC1 mantiene a Tap42 fosforilado no está claro mecanísticamente. TORC1 podría fosforilar a Tap42 directamente (Jiang and Broach, 1999) o podría actuar a través de otros como la proteína Tip41 (*Tap42 Interacting Protein*) (Figura 14) (Jacinto et al., 2001). En ambos modelos, Tap42 actúa como un inhibidor de las fosfatasa promoviendo la unión entre Tap42 y Sit4, lo cual conduce a la retención de Gln3 en el citoplasma.

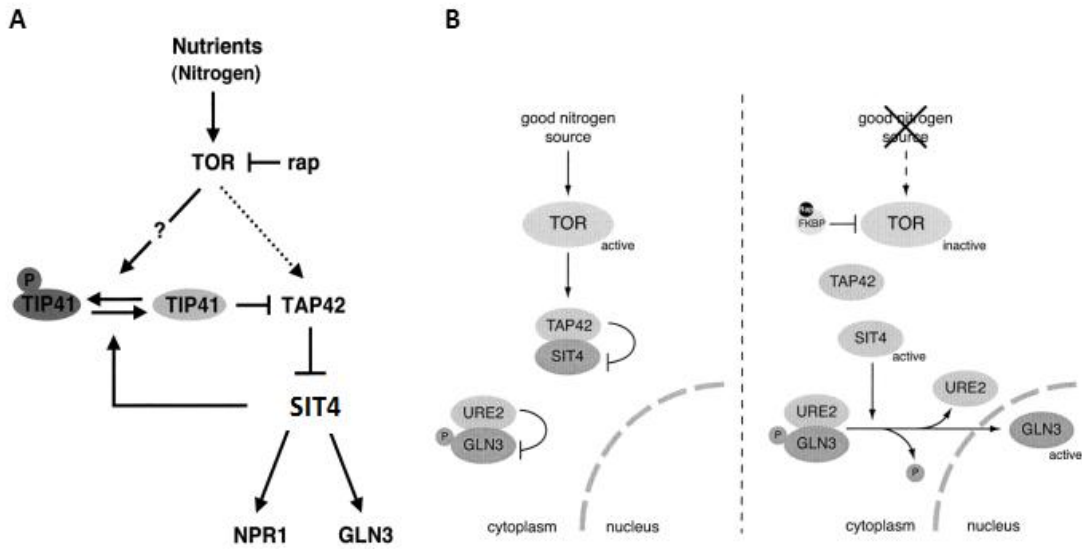


Figura 14. Modelo de regulación de las fosfatasa por TORC1. (A) Bajo condiciones óptimas de nutrientes (nitrógeno), TOR inhibe la fosfatasa Sit4 al promover la asociación de Tap42 con Sit4. O bien por fosforilación directa de Tap42 (Jiang and Broach, 1999) o bien por la acción del interactivo de Tap42, Tip41 (Jacinto et al., 2001). En este segundo modelo se propone que Tor activo fosforila e inactiva Tip41 por un mecanismo desconocido, mientras que Tor inactivo permite la desfosforilación de Tip41 que regula positivamente Sit4 al unirse e inhibir a Tap42. En cualquier caso, Tor inactivo promueve la actividad de la fosfatasa Sit4 permitiendo la activación de sus fosfoproteínas diana Npr1 y Gln3. Las flechas indican activación, las barras inhibición, Rap es rapamicina y Tor se refiere a Tor1 o Tor2. Las flechas discontinuas entre Tor y Tap42 indican que la fosforilación de Tap42 por Tor (Jiang and Broach, 1999) juega un papel menor en la regulación de Sit4 (Jacinto et al., 2001). (B) Bajo condiciones óptimas de nitrógeno (Tor activo), Gln3 está fosforilado y retenido en el citoplasma por Ure2. Bajo condiciones de ayuno de nitrógeno o de tratamiento con rapamicina, Sit4 es liberado del complejo con Tap42 y activado. Sit4 activo desfosforila el factor de transcripción Gln3. Gln3 desfosforilado se disocia del complejo con Ure2 y se transloca al núcleo donde activa la transcripción de sus genes diana. Las flechas indican activación, las barras indican inhibición (Adaptado de Crespo and Hall, 2002 y Jacinto et al., 2001).

Por otro lado, cabe destacar que se han encontrado indicios de que la asociación de Tap42 con Sit4 es requerida para la actividad de ésta (Sit4), por lo que también se ha descrito otro modelo de regulación de Gln3 dependiente de TORC1 alternativo al modelo descrito en la figura 14 (Düvel et al., 2003; Wang et al., 2003; Yan et al., 2006). El modelo de Yan propone que Tap42 es un regulador positivo de las fosfatasa con las que se asocia y que la rapamicina es la responsable de inducir la activación de las fosfatasa en un proceso transitorio que culmina con la disociación del complejo Tap42-fosfatasa.

6.5.3. Otros sustratos del complejo TOR1 (TORC1): quinasa Npr1

Además de estos dos sustratos directos de TORC1, se conoce que, entre otros, TORC1 también fosforila directamente a otros sustratos como Sfp1 (Lempiäinen et al., 2009) y Atg13 (Kamada et al., 2010). Posteriormente, un estudio de Tyer y colaboradores ha definido una red de interacción global de quinasa y fosfatasa en levadura donde han

observado que TORC1 físicamente interacciona con las siguientes proteínas (entre otras) (Breitkreutz et al., 2010): Mks1 (proteína implicada en la ruta retrograda), FMP48 (proteína que supuestamente se localiza en mitocondrias), Sky1 (dominio quinasa Serina/Arginina implicado en el *splicing* de pre-RNA_m) y Npr1 (quinasa implicada en el tráfico de permeasas).

En este trabajo de Tesis Doctoral nos centramos en el sustrato de TORC1, la quinasa Npr1, y en cómo TORC1 controla la toma de nutrientes a través de la regulación de transportadores específicos de la membrana plasmática.

Análisis de la secuencia del gen *NPR1* muestra que éste codifica para una Serina/Treonina quinasa de 86 kDa con 790 residuos de aminoácidos (Abriel et al., 1999; Vandenbol et al., 1990; Vandenbol et al., 1987). El extremo amino-terminal de Npr1 (residuos 17-413) comprende un dominio rico en serinas (26%) mientras que el extremo carboxi-terminal de Npr1 (residuos 438-742) contiene motivos de secuencia característicos de los dominios catalíticos de las proteínas quinasas (Vandenbol et al., 1990). Resulta interesante la identificación de motivos de interacción WW-PPxY en el extremo C-terminal de Npr1 (Ingham et al., 2004). Análisis de secuencia utilizando EMBnet AUSTRIA (<https://emb1.bcc.univie.ac.at/toolbox/pestfind>) también revelan la existencia de tres motivos putativos PEST en Npr1. Dos de ellos se localizan en el dominio N-terminal (residuos 33-51 y 73-105) y el otro se localiza alrededor de los motivos PPxY (residuos 680-691). Las secuencias PEST son señales de inestabilidad proteica. Fosforilaciones de las secuencias PEST son específicas para su reconocimiento y procesamiento por la vía de ubiquitinación (Lanker et al., 1996).

Npr1 es una fosfoproteína cuyo estado de fosforilación viene controlado en respuesta a la fuente de nitrógeno por la ruta de señalización TORC1 (Schmidt et al., 1998). Ante una fuente de nitrógeno óptima, TORC1 mantiene Npr1 fosforilado y en su forma inactiva. En esta conformación (inactiva), los niveles de ubiquitinación y consiguiente degradación vacuolar de Gap1 se incrementan. Sin embargo, bajo condiciones de ayuno, Npr1 es desfosforilado y activado de manera dependiente de Sit4 y Tip41 (Jacinto et al., 2001). Esta activación de Npr1 conduce al reciclaje y estabilidad de Gap1 en la membrana plasmática y a la rápida ubiquitinación y degradación de Tat2 en la vacuola (Schmidt et al., 1998). TORC1 parece regular los eventos de clasificación de las permeasas a través del complejo Tap42-fosfatasa y su efector Npr1 (Breitkreutz et al., 2010; Jacinto et al., 2001; Schmidt et al., 1998; Soetens et al., 2001).

Recientemente se ha propuesto un nuevo mecanismo en el que la quinasa TORC1 también controla la estabilidad de algunas permeasas de la membrana plasmática mediante la inhibición de la quinasa Npr1, quien a su vez inhibe al adaptador de la ubiquitina ligasa Art1 (MacGurn et al., 2011). En otro apartado de la Introducción ya

hemos comentado que este adaptador dirige a la ubiquitina ligasa Rsp5 hacia sus dianas en la membrana plasmática con el objetivo de mediar su ubiquitinación que a su vez inicia su endocitosis (Lin et al., 2008). En la figura 15 se indica el mecanismo de acción por el cual TORC1 controla la estabilidad de la membrana plasmática de la permeasa Can1 a través de la regulación de Npr1.

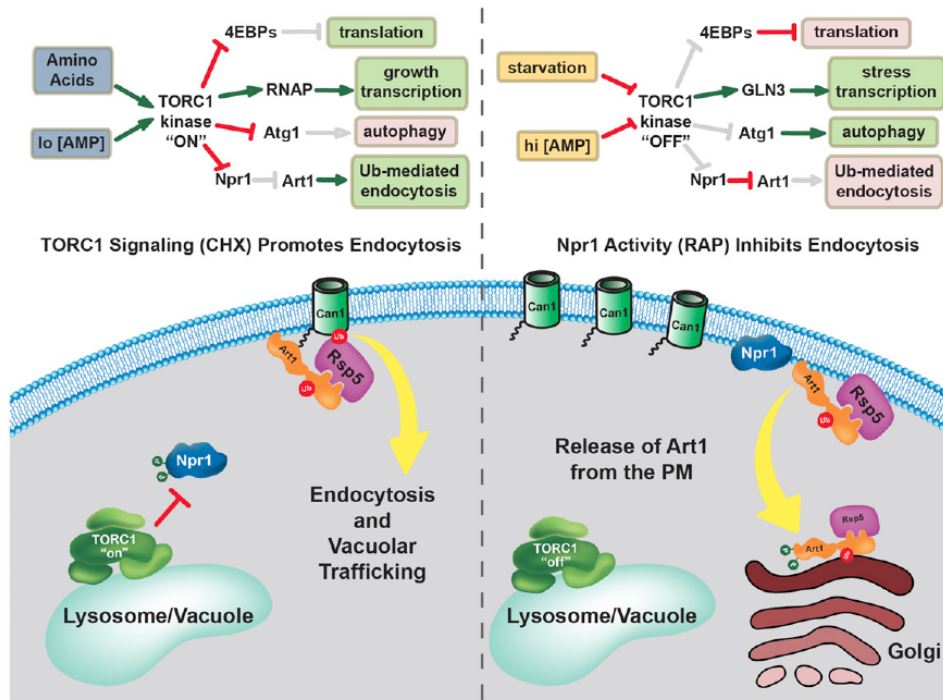


Figura 15. Mecanismo de regulación de la endocitosis dependiente de TORC1. Cuando la ruta de señalización TORC1 está “encendida” (panel de la izquierda), Npr1 está fosfoinhibido, el cual promueve la endocitosis de transportadores específicos al promover la translocación de Art1-Rsp5 hacia la membrana plasmática. Cuando la ruta de señalización TORC1 está “apagada” (panel de la derecha), igual que ocurre durante un tratamiento de rapamicina o en condiciones de ayuno, Npr1 se activa y puede fosforilar un grupo de residuos del extremo N-terminal de Art1; un estado que favorece su localización en el aparato de Golgi y citosol (inactivo). De esta manera, la ubiquitinación y posterior endocitosis de permeasas como Can1 queda prevenida y se acumula en la membrana plasmática. Las flechas y barras grises indican la pérdida de una interacción reguladora debida a reguladores aguas arriba de la vía (MacGurn et al, 2011).

Aunque existen numerosos estudios que sugieren que Npr1 posee un papel en el tráfico de los transportadores de la membrana plasmática, no existe un consenso para la función de esta quinasa en la regulación de las permeasas de nutrientes. Como ya se ha comentado previamente, se ha demostrado que Npr1 puede fosforilar Art3 *in vitro*, aunque la funcionalidad de esta modificación no está clara todavía (O'Donnell et al., 2010). También se ha demostrado que Art3 regula la ubiquitinación y endocitosis del transportador de ácido aspártico Dip5 (Hatakeyama et al., 2010). De forma similar a su papel como regulador negativo de Art1, Npr1 podría regular negativamente la endocitosis de Dip5 al fosfoinhibir Art3. También se ha demostrado que Npr1 regula la endocitosis del transportador de triptófano Tat2 (Schmidt et al., 1998). Sin embargo otros estudios sugieren que esta quinasa estabiliza en la membrana plasmática otros

transportadores como Gap1 al fosfoinhibir a los adaptadores Bul1 y Bul2 (De Craene et al., 2001; Merhi and André, 2012). Por otro lado, este modelo de regulación, propuesto por MacGurn y colaboradores, demuestra que Npr1 estabiliza en la membrana plasmática el transportador de arginina Can1 al antagonizar la función de Art1, estableciendo que Npr1 regula negativamente la endocitosis vía fosfoinhibición de Art1. Todos estos datos ponen de manifiesto que un mejor entendimiento de la fosforilación mediada por Npr1 de los adaptadores ayudaría a resolver algunos de los resultados contradictorios con respecto al papel de Npr1 como regulador de la endocitosis y posterior degradación vacuolar de permeasas de aminoácidos.

Estos resultados son muy interesantes ya que establecen un papel de TORC1 como regulador de los procesos de ubiquitinación de un conjunto de permeasas. Demostrando que diferentes señales medioambientales y nutricionales como la disponibilidad de aminoácidos, el estado energético y el estrés en el plegamiento de proteínas pueden originar cambios en la abundancia de proteínas de la membrana plasmática. Además, es posible que la endocitosis mediada por TORC1 de los transportadores de aminoácidos provea de un bucle de retroalimentación auto-inhibitorio que limite la activación de TORC1.

6.6. Señalización del Complejo TOR2 (TORC2)

Las señales que posiblemente regulan el complejo TORC2 son los ribosomas y el estrés en la membrana. En células de mamífero y presumiblemente también de levadura, TORC2 se activa por asociación directa con los ribosomas, asegurando que TORC2 permanece activo sólo en células en crecimiento activo (Loewith and Hall, 2011). Por otro lado, existen indicios de que un estrés medioambiental, como un estrés por calor, reduce la actividad de TORC2, posiblemente para prevenir el crecimiento en condiciones desfavorables (Jenkins et al., 1997; Kamada et al., 2005). Alternativamente, un estrés en la membrana plasmática inducido por o bien la inhibición del metabolismo de esfingolípidos o bien una alteración en la tensión de la membrana plasmática originada por estrés osmótico (hipo) o por daño mecánico, activan la ruta de señalización TORC2 (Berchtold et al., 2012; Roelants et al., 2011).

Los sustratos más caracterizados de TORC2 y posiblemente los principales, son las proteínas quinasas homólogas miembros de la familia AGC: Ypk1 e Ypk2 (Roelants et al., 2004). Aunque Ypk1 y Ypk2 son activadas a niveles basales por las quinasas Pkh1/2 (Casamayor et al., 1999; Roelants et al., 2002), estos niveles de actividad no son suficientes para permitir la supervivencia celular en condiciones que perturban la membrana plasmática (Roelants et al., 2004). Bajo estas condiciones TORC2 activa a Ypk2 por fosforilación de la serina 641 y la treonina 659 (Kamada et al., 2005) y a Ypk1 por fosforilación de la serina 644 y treonina 662 (Niles et al., 2012). Alelos

constitutivamente activos de *YPK1* y *YPK2* rescatan mutantes *tor2* indicando que Ypk1 y Ypk2 son los únicos responsables de llevar a cabo todas las funciones esenciales aguas abajo de TORC2 (Kamada et al., 2005; Niles et al., 2012; Roelants et al., 2011).

Otros sustratos de TORC2 son las proteínas homólogas de unión a TORC2 y a fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato (PI4,5P₂), Slm1 y Slm2. Identificadas por ser fosforiladas *in vivo* e *in vitro* de manera dependiente de TORC2 (Bultynck et al., 2006). Estas proteínas han sido relacionadas con: la polarización del citoesqueleto de actina, la biosíntesis de esfingolípidos y la endocitosis inducida por estrés térmico de la permeasa de uracilo Fur4 (Aronova et al., 2008; Audhya et al., 2004; Berchtold et al., 2012; Bultynck et al., 2006; Fadri et al., 2005; Kamada et al., 2005). Por otro lado, se ha identificado a la fosfatasa calcineurina como un regulador negativo de la actividad de TORC2 y la síntesis de esfingolípidos, antagonizando la función de las proteínas Slm (Bultynck et al., 2006; Mulet et al., 2006; Tabuchi et al., 2006). Las proteínas Slm también son necesarias para la fosforilación por TORC2 de Ypk1 (Berchtold et al., 2012; Niles et al., 2012; Roelants et al., 2011). Condiciones de estrés en la membrana originan la relocalización de las proteínas Slm1 y Slm2 a la región de la membrana que contiene a TORC2. Esta relocalización conduce a la activación de Ypk1 por TORC2, supuestamente porque Slm1 y Slm2 reclutan a Ypk1 hasta TORC2. Otras evidencias indican que Avo1 es la subunidad de TORC2 responsable del reconocimiento del sustrato Ypk1 (Liao and Chen, 2012).

De las rutas de señalización controladas por TORC2 (Figura 13), la primera en caracterizarse ha sido la polarización del citoesqueleto de actina. Una de las primeras indicaciones de la relación de TORC2 con la actina fue el descubrimiento de que sólo mutantes *tor2* (no *tor1*) presentaban una alteración en la organización de la actina (pérdida de la polarización en los parches de actina) (Schmidt et al., 1996) así como la posterior implicación de su dominio quinasa en el mantenimiento de un normal citoesqueleto de actina a través de la vía de integridad celular (Helliwell et al., 1998b; Schmidt et al., 1996; Zheng et al., 1995). Esta ruta responde a señales de crecimiento y estrés para dirigir la síntesis de la pared celular vía la GTPasa Rho1 (Schmidt et al., 1997). TORC2 regula el citoesqueleto de actina a través del factor Rom2 que media la activación por Rho1 de la cascada de señalización de la quinasa Pkc1 (Aronova et al., 2008; Loewith et al., 2002; Schmidt et al., 1997). Mutantes *tor2* son rescatados por efectores aguas abajo de la vía de señalización Pkc (Helliwell et al., 1998). Otro efector aguas abajo de TORC2 importante para la polimerización de la actina y la integridad de la pared celular es la quinasa Ypk2 (Kamada et al., 2005). Una distribución al azar de la actina es uno de los fenotipos característicos de los mutantes *ypk1* y *ypk2* (Schmelzle et al., 2002).

La implicación de TORC2 en la regulación de la endocitosis surgió tras la observación de que la internalización del factor α de la feromona se ve alterada en mutantes *ypk1* (deHart et al., 2002). Sin embargo, los mecanismo por los que Ypk1 regula la endocitosis están poco definidos. Ypk1 no es necesario para las modificaciones de los *cargos* que inducen su internalización (fosforilación o ubiquitinación); probablemente tenga un papel en la fosforilación de los componentes de la maquinaria endocítica. También mutantes *tor2* o en genes importantes para la integridad de la pared celular (*ROM2* y *RHO1*) mostraron defectos en la endocitosis, incluso tras la eliminación de la pared celular, demostrando su implicación en la endocitosis con independencia de su función en la síntesis de la pared celular o la integridad estructural (deHart et al., 2003). Particularmente Tor2 parece estar implicado en el control del reclutamiento de algunos factores endocíticos (Abp1 y Rvs167) facilitando la internalización del factor α (deHart et al., 2003; Tenay et al., 2013). Es posible que la pérdida de la función de Tor2 afecte a la internalización endocítica de los *cargos* por la menor eficiencia en la escisión endocítica. Además, se piensa que PI(4,5)P₂ facilita la localización de la maquinaria endocítica en la membrana plasmática para iniciar la endocitosis. Esta regulación de TORC2 en la dinámica de la maquinaria endocítica facilita un *crossstalk* entre la maquinaria endocítica (Abp1 y Rvs167) y la bicapa lipídica (PI(4,5)P₂) (Kishimoto et al., 2011; Tenay et al., 2013). Los lípidos también juegan un papel en la endocitosis (D'Hondt et al., 2000). Tanto los esfingolípidos como sus precursores (bases esfingoides y ceramidas) han sido propuestos como activadores (aunque poco entendidos) de la endocitosis.

El otro proceso regulado por TORC2 es la biosíntesis de esfingolípidos. Los esfingolípidos son componentes estructurales esenciales de la bicapa lipídica y sirven como moléculas de señalización. TORC2 regula la producción de esfingolípidos (síntesis de ceramidas) activando Ypk2 (Aronova et al., 2008). Este paso biosintético controlado por TORC2 y Ypk2 viene antagonizado por la fosfatasa calcineurina (Aronova et al., 2008; Mulet et al., 2006). Otra diana de TORC2 y Ypk1 en la regulación de esfingolípidos son las proteínas Orm. TORC2 es sensor y responde a los bajos niveles de esfingolípidos activando a Ypk1 que inhibe las proteínas Orm1 y Orm2, las cuales son unos reguladores negativos del primer paso de la biosíntesis de esfingolípidos (inhiben la enzima serina-palmitoiltransferasa, SPT) (Roelants et al., 2011; Berchtold et al., 2012). Se ha propuesto la fosforilación por Ypk1 de las proteínas Orm como una respuesta celular a la reducción de esfingolípidos. Por lo tanto, la vía de señalización TORC2/Ypk1 es un regulador de la homeostasis de lípidos en la membrana plasmática. Recientemente también se ha propuesto otro modelo de regulación de la biosíntesis de esfingolípidos por TORC1 a través de su efector Npr1. La inhibición de TORC1 activa Npr1, que a su vez activa Orm1 y Orm2, que a su vez estimulan la síntesis de esfingolípidos aguas abajo de la enzima SPT en un mecanismo todavía poco definido (Shimobayashi et al., 2013).

El conjunto de los datos descritos podría sugerir que tanto TORC1 como TORC2 podrían estar implicados en la internalización y degradación vacuolar de permeasas de nutrientes. Existen evidencias en la literatura sobre *crossstalk* entre TORC1 y TORC2 en procesos como la autofagia o la biosíntesis de esfingolípidos (Vlahakis et al., 2014), posiblemente como parte de un bucle de retroalimentación para garantizar la homeostasis de aminoácidos y lípidos (Vlahakis et al., 2014; Shimobayashi et al. 2013). En este caso, mientras que TORC1 tiene un papel en la señalización que media la ubiquitinación de permeasas, TORC2 podría tener un papel más general en el control de la actina y la composición lipídica de la membrana que afectaría al mecanismo de endocitosis. Un defecto en la organización de la actina ha sido correlacionado con defectos en la endocitosis, como ha sido observado en mutantes *tor2* (Schmidt et al., 1996). Las proteínas Ypk podrían mediar TORC2 y las señales de esfingolípidos para regular y coordinar la polarización de la actina que afectaría al mecanismo de endocitosis (Aronova et al., 2008). No parece que TORC2 regule el propio mecanismo de endocitosis en sí. Es posible que éste se altere como respuesta a cambios en la presión de la membrana plasmática (síntesis de la pared celular o crecimiento polarizado) (Morris and Homann, 2001).

Hasta este momento nos hemos centrado fundamentalmente en los transportadores de la membrana plasmática cuya función es transportar **nutrientes** (glúcidos, aminoácidos y bases nitrogenadas), así como en el tipo de regulación a la que se encuentran sujetos. Sin embargo, en la membrana plasmática existen otras proteínas encargadas del transporte de otro tipo de compuestos como son los iones, cuyos mecanismos de regulación están menos caracterizados en lo que respecta a su mecanismo de endocitosis y posterior tráfico a la vacuola, y que son fundamentales en la homeostasis de iones.

7. La homeostasis de iones en el organismo modelo *S. cerevisiae*

El mantenimiento de concentraciones intracelulares apropiadas de cationes, principalmente K^+ y Na^+ , es de suma importancia para las células vivas ya que determinan el volumen celular, el pH intracelular y el potencial a través de la membrana plasmática, entre otros parámetros celulares importantes.

Las concentraciones de iones intracelulares deben mantenerse dentro de un rango para evitar sus efectos tóxicos. En un contexto fisiológico, mientras que el potasio acumulado en una relativa gran cantidad en distintos tipos celulares resulta imprescindible en muchas funciones fisiológicas, el sodio, acumulado en altas concentraciones resulta un catión tóxico. Este efecto tóxico es debido tanto al el estrés

osmótico que proporciona como al efecto tóxico del catión en sí. Por ejemplo, el sodio y el litio acumulados en altas concentraciones en el citosol pueden inhibir la actividad enzimática de la familia de fosfatasas Hal2, lo cual impide la síntesis de metionina y el consiguiente acúmulo de un compuesto metabólico tóxico (Murguía et al., 1995, 1996).

Las levaduras, por tanto, han desarrollado una serie de estrategias para adaptarse a las grandes variaciones en las concentraciones de estos cationes en el medio ambiente, básicamente mediante el control de sus procesos de transporte. Esencialmente la levadura mantiene un ratio bajo de sodio/potasio gracias a una toma eficiente y selectiva de potasio (y no sodio), a una eficiente salida del exceso de sodio y a un eficiente secuestro de sodio en la vacuola. Algunos estudios en el “ionoma” de levadura han demostrado un papel de las mitocondrias, vacuolas y la maquinaria *ESCRT* en la regulación de la homeostasis de iones (Eide et al., 2005; Yu et al., 2012).

En el organismo modelo *S. cerevisiae* se han caracterizado al menos 10 transportadores específicos de cationes diferentes (Figura 16).

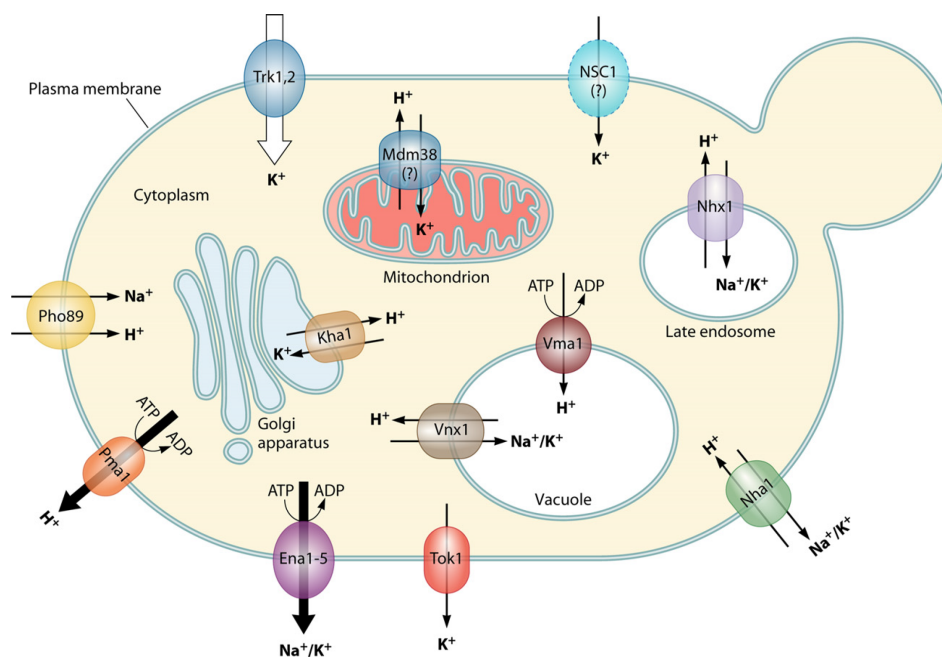


Figura 16. Principales transportadores catiónicos intracelulares y de la membrana plasmática en *S. cerevisiae*. En la figura se representan los principales transportadores Na^+/K^+ de levadura localizados en la membrana plasmática y en las membranas de los diferentes orgánulos intracelulares (Arino et al., 2010).

En el caso de los transportadores de la membrana plasmática que transportan cationes, se ha observado que estos poseen varias funciones como: suministrar a las células una cantidad suficiente de potasio, mantener la homeostasis de potasio, eliminar los cationes tóxicos como sodio o litio, preservar el potencial de membrana,

regular el pH intracelular, mantener un turgor positivo en el interior celular (necesario para la membrana plasmática/expansión de la pared celular y la división celular) y combatir el estrés osmótico. Se han caracterizado 6 transportadores en la membrana plasmática responsables de la realización de las funciones descritas. Estos son el sistema de toma de potasio Trk1 y Trk2, el canal de salida de potasio Tok1, el simportador Pho89 de Pi-Na^+ , el sistema de salida de K^+ y Na^+ , la ATPasa Ena1 y el antiportador Na^+/H^+ Nha1. Además de estos seis transportadores específicos, existe un canal catiónico cuya actividad ha sido demostrada por experimentos de electrofisiología pero cuyo gen todavía permanece sin caracterizar y que es conocido como NSC1 (*Non-Specific Channel 1*) y algunos otros transportadores no específicos que implican flujos marginales de potasio y sodio a través de la membrana plasmática como Pmp3 y Qdr2 (Arino et al., 2010).

Aunque no está implicada directamente en el transporte de sodio/potasio, la ATPasa de protones Pma1 es fundamental para generar el gradiente electroquímico que dirige la toma de nutrientes y de K^+ . Entre otras funciones también determina el pH citosólico. El gen *PMA1* que codifica para la ATPasa de protones de la membrana plasmática, está conservado en plantas y hongos y presenta una fuerte homología en la secuencia de aminoácidos con las ATPasas de tipo P [Na^+ , K^+] y las ATPasas- Ca^{2+} de mamíferos (Serrano et al., 1986). Se ha estimado que la ATPasa Pma1 consume un 25% del ATP celular bombeando protones hacia al exterior y generando el gradiente electroquímico que conduce la toma de nutrientes dependiente de H^+ (Goffeau and Slayman, 1981; Perlin et al., 1988; Serrano, 1984). Células de levadura con mutaciones que reducen la actividad de Pma1 muestran una reducción en la toma de muchos nutrientes (Vallejo and Serrano, 1989). En *S. cerevisiae* existe un segundo gen, *PMA2*, el cual posee un 90 % de identidad a *PMA1* (Schlesser et al., 1988). Sin embargo, en condiciones estándar de crecimiento este gen se expresa en niveles muy bajos por lo que no posee un impacto importante en la homeostasis de iones (Supply et al., 1993). La regulación a nivel transcripcional de *PMA1* depende de la fuente de carbono, la entrada en la fase estacionaria y las condiciones de estrés (Fernandes and Sá-Correia, 2003; Portillo, 2000; Rao et al., 1993), mientras que a nivel de proteína la actividad de Pma1 se ve aumentada en presencia de glucosa así como también por un medio acidificado (Eraso and Gancedo, 1987; Serrano, 1983). El mecanismo de activación en respuesta a pH ácido no está claro todavía, tampoco en respuesta a glucosa, aunque si se ha demostrado que la actividad de Pma1 aumenta presuntamente por fosforilación en su extremo C-terminal. Algunos sitios de fosforilación han sido identificados como la treonina 912 y la serina 911 (Lecchi et al., 2007). Las quinasas Ptk2 y Hrk1 también han sido identificadas como reguladoras positivas de la actividad de Pma1. Se han presentado evidencias experimentales de que Ptk2 es necesaria para la fosforilación de la serina 899 de Pma1 (Eraso et al., 2006; Goossens et al., 2000).

Por otro lado, la extrusión de iones tóxicos como el sodio o el litio, depende principalmente de los genes *NHA1* y *ENA1* en *S. cerevisiae*. Nha1 es un antiportador Na^+/H^+ cuya actividad es más importante a pH ácido. Ena1 es la proteína codificada por el primer gen de una tanda de 4-6 genes repetidos. La actividad de esta ATPasa de tipo P es importante para la extrusión de Na^+ (también Li^+ y K^+) a pH alcalino (Bañuelos et al., 1998). Mientras que *NHA1* se expresa de manera constitutiva, la expresión de *ENA1* está altamente regulada por varias vías de señalización, como por ejemplo la MAP quinasa Hog1 y calcineurina (Proft and Serrano, 1999; Ruiz et al., 2003).

Respecto al transporte intracelular de cationes, éste comprende fundamentalmente los antiportadores de cationes alcalinos metálicos/ H^+ de la membrana vacuolar (Vnx1), endosomal (Nhx1) y del aparato de Golgi (Kha1). También, aunque el gen no ha sido todavía descrito, existe un intercambio muy eficiente de K^+ por H^+ en la membrana mitocondrial. Así, de forma similar a los transportadores de la membrana, los orgánulos sirven para regular la homeostasis catiónica a nivel del citosol. Estos se encargan de mediar la detoxificación del sodio por secuestro en la vacuola, el mantenimiento y regulación de la homeostasis de potasio y del pH de los orgánulos, así como la modulación del tráfico de proteínas de la vía secretora (Arino et al., 2010).

Con todo este panorama de flujos de cationes extra e intracelulares, cabe destacar que un defecto de las muchas aproximaciones empleadas rutinariamente en el estudio de la homeostasis de iones en levadura es que no siempre consideran la distribución intracelular de los distintos iones. Las células de levadura acumulan muchos solutos (incluidos cationes) en sus vacuolas. Este secuestro en las vacuolas es importante para una adecuada homeostasis y supervivencia en respuesta a condiciones de estrés iónico (Nass et al., 1997; Okorokov et al., 1980; Perkins and Gadd, 1993). Los primeros intentos para medir la cantidad de potasio en las células indicaron que la cantidad de potasio es similar en el citoplasma y en el núcleo y que las vacuolas acumulan la mitad del potasio del citosol (Roomans and Sevéus, 1976). Otro estudio más reciente, realizado en diferentes condiciones de crecimiento, confirma la acumulación de potasio y sodio en la vacuola (relativa al citosol) observada por otros autores y demuestra que el núcleo contiene un porcentaje importante del total del potasio intracelular (y sodio en el caso de estar presente en el medio) que se mantiene constante bajo diferentes condiciones (Herrera et al., 2013; Montiel and Ramos, 2007; Okorokov et al., 1980; Perkins and Gadd, 1993). Herrera y colaboradores proponen que el potasio y el sodio entran de forma no específica a través de poros nucleares y actúan neutralizando las cargas negativas de este orgánulo de la misma manera que se ha visto en mamíferos (Strick et al., 2001).

7.1. El transporte de K⁺ y su relevancia funcional

El potasio es un componente esencial de las células vivas, las cuales tienden a mantener las concentraciones intracelulares muy superiores a aquellas presentes en sus hábitats naturales. En condiciones normales de crecimiento, la concentración intracelular de potasio en el organismo modelo *S. cerevisiae* oscila entre 200-300 mM. Sin embargo, *S. cerevisiae* es capaz de crecer incluso en presencia de bajas concentraciones (< 1 mM).

El potasio, además de ser el principal catión celular, es requerido para muchas funciones fisiológicas como la regulación del volumen celular y del pH intracelular, el mantenimiento de un potencial estable en la membrana plasmática, la compensación de las cargas negativas en muchas macromoléculas, la síntesis proteica y la activación enzimática (LUBIN and ENNIS, 1964; Merchan et al., 2004; Page and Di Cera, 2006).

Se han llevado a cabo varias aproximaciones con el fin de caracterizar los cambios producidos por el ayuno de potasio, así como las respuestas celulares que llevan al restablecimiento de la homeostasis de potasio. Tras varias horas de ayuno de potasio se ha observado que se produce una pérdida del 70% del potasio interno, el volumen celular disminuye un 20% y las células se hiperpolarizan, sin embargo el pH permanece invariable (Navarrete et al., 2010). Por otro lado, la respuesta transcripcional al ayuno de potasio ha sido estudiada de dos maneras distintas. Experimentos donde las células son cultivadas en biorreactores con concentraciones limitantes de potasio han revelado una toxicidad por amonio en condiciones de potasio limitante sugiriendo que las células responden a esta toxicidad secretando aminoácidos (Hess et al., 2006). Sin embargo, la respuesta al ayuno de potasio a tiempos cortos (células cultivadas en medio con potasio no limitante y luego transferidas un medio de bajo potasio (15 µM)), indican que la mayor respuesta se produce a los 60 minutos del ayuno y entre los efectos que se observan son el estrés oxidativo, alteraciones en el metabolismo del azufre, ayuno de fosfato, pronunciada reducción de genes necesarios para la biogénesis del ribosoma y la traducción, activación de la ruta retrograda, alteración de los genes relacionados con ciclo celular y los perfiles de expresión proteica, así como un bloqueo del ensamblaje del citoesqueleto (septinas) (Barreto et al., 2012; Canadell et al., 2015). Por otro lado, aproximaciones proteómicas han indicado un marcado descenso de la cantidad total de proteínas recuperadas tras prolongados ayunos de potasio (Curto et al., 2010; Gelis et al., 2012). También un modelo matemático ha establecido que la extrusión de protones y un aumento en la tasa de la reacción de bicarbonato son vitales para el mantenimiento de una mínima concentración de potasio interno en respuesta a un repentino ayuno de potasio (Kahm et al., 2012). Sin embargo, los mecanismos por los cuales las células perciben y señalizan los cambios en las concentraciones de potasio externo son todavía desconocidos.

7.2. Sistemas de transporte de K⁺ y su regulación

Las células de *S. cerevisiae* poseen sistemas de toma de potasio de alta y baja afinidad que dependen en gran medida del estado de crecimiento de las células y del medio empleado (Rodríguez-Navarro and Ramos, 1984). El transportador de potasio Trk1 es el responsable de mediar la toma de la mayoría del potasio en células de *S. cerevisiae*. Sin embargo, debemos mencionar que en las células existe un sistema de toma de potasio ectópico independiente del sistema Trk (Madrid et al., 1998). De hecho, ha sido propuesta la existencia de un sistema de toma de potasio de “muy baja afinidad” que está mediado por múltiples procesos de transporte (Arino et al., 2010). Candidatos para estos sistemas de toma de potasio no específico que implican flujos marginales de potasio a través de la membrana plasmática son el antiportador Qdr2 o la pequeña proteína hidrofílica Pmp3, además de permeasas de glucosa y aminoácidos (Ko et al., 1993; Navarre and Goffeau, 2000; Vargas et al., 2007; Wright et al., 1997). También existe un canal de entrada de potasio, cuyo gen todavía permanece sin caracterizar, conocido como NSC1 (*Non-Specific Cation channel 1*). Recientemente se ha propuesto un papel para las proteínas Kch1 y Kch2 como transportadores o canales de potasio. Sin embargo los resultados también indican que estos transportadores no son responsables de toda la toma de potasio de baja afinidad sugiriendo la existencia de mecanismos adicionales, probablemente mediados por los sistemas descritos más arriba (Stefan et al., 2013).

7.2.1. El sistema de alta afinidad de transporte de K⁺ Trk1 y Trk2

En este trabajo nos vamos a centrar en el sistema de toma de potasio de alta afinidad descrito en *S. cerevisiae*, el cual permite a las células tomar el catión incluso cuando está presente a muy bajas concentraciones y que está codificado por los genes *TRK1* y *TRK2* (Gaber et al., 1988; Ko and Gaber, 1991). El gen *TRK1* que codifica para el transportador de la membrana plasmática más activo y fisiológicamente relevante corresponde a una proteína de 1235 aminoácidos. Ésta posee 8 dominios transmembrana y 4 estructuras MPM (Membrana-Poro-Membrana) (Figura 17) (Durell and Guy, 1999; Gaber et al., 1988). Al igual que la ATPasa de protones Pma1, Trk1 es una proteína integral de la membrana plasmática, y como muchos transportadores de la membrana plasmática, se encuentra asociada a las fracciones de membrana resistentes a detergentes o fracciones DRM (*Detergent-Resistant Membrane*) (Lauwers and André, 2006). Estas fracciones de membrana están enriquecidas en esfingolípidos que contienen inositol y ergosterol (el principal esteroide estructural de los hongos) (Bagnat et al., 2000). Se ha descrito además que estos esfingolípidos participan en el tráfico de proteínas a la membrana plasmática (Bagnat et al., 2001; Bagnat et al., 2000; Umebayashi and Nakano, 2003). Por otro lado, cabe destacar que la delección del gen *TRK1* afecta substancialmente la toma de potasio de alta afinidad. Células que carecen

de ambos genes *TRK1* y *TRK2* muestran un dramático descenso en la afinidad por el transporte de potasio ($K_m \sim 20 \text{ mM}$) y menor V_{max} ($\sim 5 \text{ nmol min}^{-1} (\text{mg cells})^{-1}$) y consecuentemente sólo pueden crecer cuando el medio presenta altas concentraciones relativas de potasio ($> 5 \text{ mM}$). Además, la regulación de la actividad del sistema Trk afecta no sólo a la concentración intracelular de potasio y a la turgencia de las células (Merchan et al., 2004) sino también al potencial eléctrico de membrana (Mulet et al., 1999) y al pH intracelular (Yenush et al., 2002).

En estudios genéticos llevados a cabo en levadura se han identificado varias proteínas implicadas en la regulación del transporte de potasio (Figura 17). Por ejemplo la proteína fosfatasa Ppz1, que desactiva Trk1 y que es a su vez desactivada por una subunidad inhibidora Sis2/Hal3 (de Nadal et al., 1998; Yenush et al., 2002). Ppz1 interactúa físicamente con Trk1 y la asociación entre Hal3 y Ppz1 responde a cambios en el pH (Yenush et al., 2005). Se ha descrito otra fosfatasa, calcineurina, como necesaria para la activación de Trk1 y Trk2 ante un estrés causado por sodio (Mendoza et al., 1994). Mas tarde se observó que dicha regulación requiere de la quinasa Hal5 (Casado et al., 2010). Otras proteínas implicadas en la regulación del transporte de potasio son la proteína quinasa Sky1 (Forment et al., 2002), la proteína inducida por estrés osmótico Hal1 (Rios et al., 1997), la proteína G de la súper familia Ras Arl1 (Munson et al., 2004) y las proteínas quinasas Hal4 y Hal5 (Mulet et al., 1999), cuya función parece estar relacionada con la regulación positiva del sistema Trk1-Trk2 y que van a ser descritas en mayor detalle a continuación.

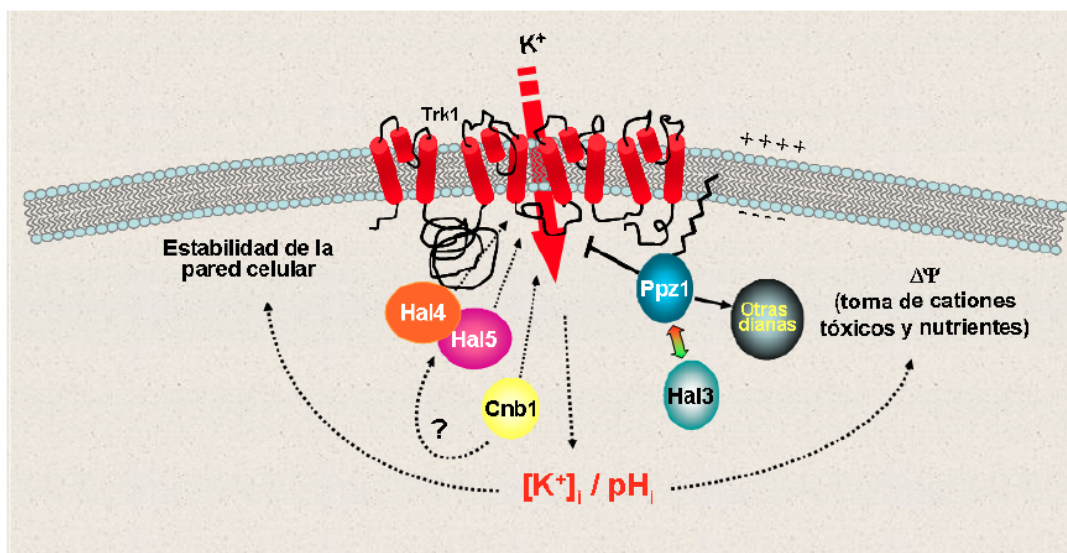


Figura 17. Modelo de regulación del sistema de transporte de potasio Trk1. La regulación de la actividad del sistema Trk afecta a la concentración intracelular de potasio y a la turgencia de las células, al potencial eléctrico de membrana y al pH intracelular. En el esquema se muestran algunas de las proteínas que participan en la regulación del transporte de potasio mediado por el sistema Trk1-Trk2 en *S. cerevisiae*.

7.2.2. Las proteínas quinasas Hal4 y Hal5 y otras quinasas de la familia NPR/HAL5

Las proteínas Sat4/Hal4 y Hal5 son dos Serina/Treonina quinasas parcialmente redundantes que fueron identificadas por su capacidad de conferir tolerancia a la salinidad (halotolerancia) por sobreexpresión en *S. cerevisiae* (Mulet et al., 1999).

Estudios genéticos sugirieron que estas dos quinasas actúan regulando de forma positiva el sistema de transporte de potasio Trk1-Trk2. Esta hipótesis está basada en la observación de que la disrupción de los genes *HAL4* y *HAL5* da lugar a un fenotipo muy parecido al del mutante *trk1 trk2* y a que el mutante *hal4 hal5* requiere la adición de potasio para crecer en medio mínimo. Además, la sobreexpresión de los genes *HAL4* o *HAL5* sólo es capaz de conferir tolerancia a salinidad en cepas en las que estén presentes los transportadores de potasio Trk1 y Trk2 (Mulet et al., 1999).

Basándonos en la homología de secuencia de los dominios catalíticos, podemos decir que Hal4 y Hal5 pertenecen a la subfamilia de quinasas *NPR/HAL5* (Figura 18). Esta subfamilia incluye también a las quinasas Ptk2, Ptk1 y Npr1, dedicadas a la regulación de transportadores de la membrana plasmática (Rubenstein and Schmidt, 2007).

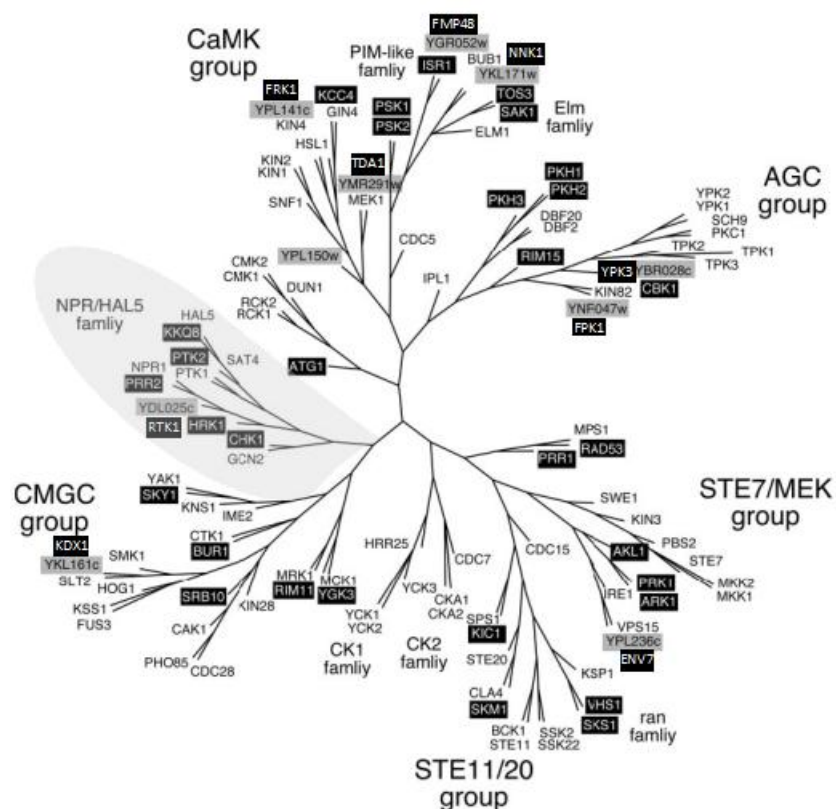


Figura 18. Representación esquemática de las 112 proteínas quinasas de *S. cerevisiae*. Los principales grupos y familias de proteínas quinasas se muestran con letra más grande. Las quinasas que se han nombrado o renombrado después de la primera aparición de este dendograma (Hunter y Plowman, 1997) se muestran con texto en blanco sobre fondo negro. Las quinasas que aún no han sido caracterizadas se muestran con texto sobre fondo gris (Adaptado de Rubenstein and Schmidt, 2007).

La quinasa Ptk2 fue inicialmente identificada como una proteína quinasa requerida para el transporte de poliaminas (Kaouass et al., 1997; Nozaki et al., 1996). Posteriormente, se descubrió que Ptk2 también era necesaria en la activación por fosforilación de la ATPasa de protones de la membrana plasmática Pma1 en respuesta al metabolismo de glucosa. Además, se ha observado que Ptk2 es necesaria para la fosforilación del extremo C-terminal de Pma1 (Eraso et al., 2006). Esta quinasa también induce la toma de diferentes cationes como litio, metilamonio y poliaminas, ya que al activar Pma1 aumenta el potencial de la membrana plasmática (interior negativo). Estos parámetros biofísicos determinan la toma de cationes tóxicos por diferentes sistemas de transporte. Por ello, el mutante para el gen *PTK2* es tolerante a varios cationes tóxicos como el litio, el sodio, la higromicina B, el manganeso, el tetrametilamonio y las poliaminas (Goossens et al., 2000). En este mismo estudio fue identificado también (otro miembro de la familia) Hrk1 como posible regulador de Pma1.

La quinasa Npr1 es una proteína que pertenece a la familia de proteínas Serina/Treonina quinasas dedicadas a la regulación de los transportadores de la membrana plasmática. Su actividad viene regulada por la ruta de señalización TOR (*Target of rapamycin*), una ruta que controla principalmente el crecimiento celular (Barbet et al., 1996; Thomas and Hall, 1997) y de la que ya hemos hablado en profundidad en otro apartado de esta Introducción.

El resto de proteínas quinasas de este grupo son Kkq8, Prr2, Rtk1, Chk1 y Gcn2. Todas estas proteínas están poco caracterizadas y/o poseen otras funciones que en principio no están relacionadas con la regulación de transportadores de la membrana plasmática. Por ejemplo, Kkq8 no ha sido caracterizada, Prr2 inhibe la señalización inducida por feromona aguas abajo de MAPK (posiblemente a nivel transcripcional por el factor de transcripción Ste12), Rtk1 participa en la biogénesis del ribosoma y Chk1 es un punto de control del daño celular (Burchett et al., 2001; Goossens et al., 2000; Hinnebusch, 2005; Hunter and Plowman, 1997; Liu et al., 2000). Por otro lado, la quinasa Gcn2 juega un papel importante en la ruta de respuesta al ayuno de aminoácidos (ruta GCN). La fosforilación del factor de iniciación 2 (eIF2) por Gcn2 conduce a un aumento en la expresión del factor de transcripción Gcn4, necesario para la inducción de los genes de biosíntesis de aminoácidos (Hinnebusch, 2005).

8. Papel de las quinasas Hal4 y Hal5 en la regulación de Trk1 y otros transportadores de la membrana plasmática

Como ya se ha comentado en el apartado anterior, en el laboratorio del Dr. Ramón Serrano se identificaron los genes que codifican para las proteínas quinasas *HAL4/SAT4* y *HAL5* como genes capaces de conferir tolerancia a cationes tóxicos al ser sobreexpresados en una cepa silvestre (Mulet et al, 1999). La caracterización de estos dos genes reveló que eran activadores parcialmente redundantes del transporte de potasio ya que actuaban modulando positivamente Trk1 y Trk2. Ello generó la hipótesis de que el sistema Trk1 pudiera ser controlado directamente por eventos de fosforilación. Previamente se había observado que la fosforilación *in vivo* de Trk1 aumentaba con la sobreexpresión de *HAL5* (Yenush et al., 2005). Sin embargo, todo parecía indicar que probablemente este aumento se debiera a un aumento en los niveles de proteína. No se pudo detectar la fosforilación *in vitro* de Trk1 por Hal5, por lo que no fue posible concluir si la regulación de Trk1 por Hal4 y Hal5 se produce de forma directa o indirecta (L. Yenush, datos no publicados). Un trabajo posterior ha demostrado que Hal4 y Hal5 son requeridos para la estabilización en la membrana plasmática de Trk1 bajo condiciones de potasio limitante, previniendo así su degradación vacuolar (Perez-Valle et al., 2007).

Se ha descrito que el mutante *hal4 hal5* no presenta ningún defecto a nivel estructural en la membrana plasmática en condiciones de potasio limitante ya que se ha visto que la localización de la proteína estructural Sur7 es completamente normal en estas condiciones. Sin embargo, en dicho mutante otras proteínas transportadoras de la membrana plasmática presentan un acumulo vacuolar similar al observado para Trk1 (Perez-Valle et al., 2007). Por lo que el papel de estas quinasas no está restringido al transportador Trk1. Algunos transportadores de nutrientes como las permeasas Can1 (arginina), Fur4 (uracilo) y Hxt1 (glucosa) se acumulan en la vacuola en el doble mutante *hal4 hal5* bajo condiciones limitantes de potasio en el medio (Figura 19). Estos datos son consistentes con un nuevo mecanismo de regulación de un conjunto de transportadores influenciados tanto por las proteínas quinasas como por los niveles intracelulares de K^+ . Sin embargo el mecanismo molecular responsable de este modo de regulación se encuentra todavía sin caracterizar.

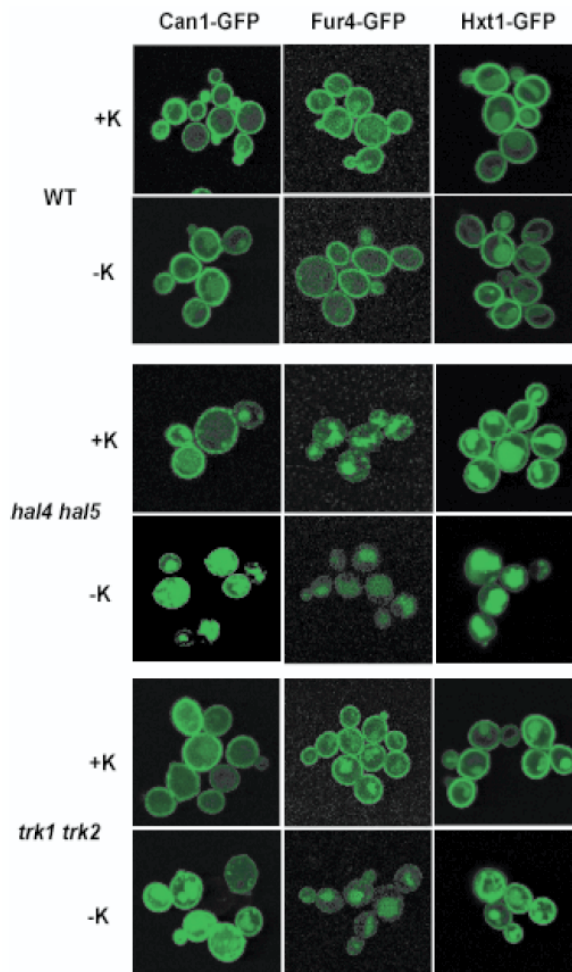


Figura 19. Localización subcelular de permeasas de nutrientes en las cepas silvestre, *hal4 hal5* y *trk1 trk2*. Las cepas indicadas fueron transformadas con plásmidos que expresan fusiones de GFP con las proteínas Can1, Fur4 y Hxt1, crecidas hasta fase logarítmica en medio mínimo suplementado con potasio, incubadas en medio sin o con suplemento de potasio durante 2 horas y analizadas por microscopia confocal (Perez-Valle et al, 2007).

Por otro lado, estudios de la localización subcelular de la proteína Hal4 y Hal5 realizados en el laboratorio indican que ambas proteínas se localizan en la fracción soluble e insoluble, y en ésta última especialmente en condiciones de potasio limitante (C. Primo, datos no publicados). De hecho un estudio reciente ha demostrado la localización mitocondrial (mt) de una fracción de Hal4, sugiriendo una función dual para esta proteína, además de su implicación en la tolerancia salina y la estabilización de permeasas en la membrana plasmática (Gey et al., 2014). En este estudio se sugiere un papel regulador de Hal4 en los últimos pasos de maduración de un subconjunto de proteínas hierro-azufre mitocondriales, que incluyen a Aco1 y la lipoato sintasa Lip5. Estos datos son consistentes con resultados obtenidos en nuestro laboratorio (y que van a ser presentados en este trabajo de Tesis) donde observamos una sobre-representación de mensajeros relacionados con la biosíntesis de ATP, el metabolismo aerobio y el transporte de electrones, evidencias de una posible relación funcional de las quinasas Hal4 y Hal5 y las mitocondrias (Perez-Valle et al., 2010).

Además, según la base de datos *Saccharomyces Genome Database* (SGD, <http://www.yeastgenome.org>) existen 57 interacciones físicas y 91 genéticas con la proteína Hal4. Entre las interacciones físicas destaca la proteína Art4, una proteína de la familia ARTs implicada en la endocitosis dependiente de ubiquitina, mientras que entre las interacciones genéticas destacan las interacciones con genes como: *ENA1*, la bomba ATPasa de sodio, *HAL5*, *NPR1*, proteína quinasa implicada en la estabilización de algunas permeasas de aminoácidos de la membrana plasmática, *PTK2*, proteína quinasa implicada en la regulación del transporte iónico a través de la membrana plasmática, *RIM15*, proteína quinasa implicada en la proliferación celular en respuesta a nutrientes, *PPZ1*, proteína fosfatasa implicada en la regulación del transporte de potasio, *SIT4*, fosfatasa requerida entre muchas funciones para el tráfico ER-Golgi, *TAP42*, proteína esencial implicada en la ruta de señalización TOR (físicamente interacciona con las proteínas fosfatasa 2A y Sit4), *TOR1*, proteína quinasa diana de la rapamicina y subunidad del complejo TORC1 y *TRK2*, componente del sistema de transporte de potasio.

Respecto a la proteína Hal5, en la bases de datos del SGD se han descrito 39 interacciones físicas donde destaca el transportador de metales divalentes Smf1 y 116 interacciones genéticas donde destacan: *BMH1*, proteína 14-3-3 que controla el proteoma a nivel post-transcripcional, una proteínas y DNA, regula la exocitosis, así como el transporte vesicular entre otras funciones, *RIM101*, factor de transcripción de tipo *Zinc-finger* y otras proteínas como *NPR1*, *PPZ1* y su homóloga *HAL4*.

Cabe destacar que en ambos casos aparecen representadas las categorías funcionales de homeostasis de iones, tráfico vesicular, así como la ruta TOR.

Sin embargo, aunque muchos son los estudios realizados con el objetivo de caracterizar estas proteínas quinasas, la mayoría son estudios de alto rendimiento (Fasolo et al., 2011; Gey et al., 2014; Iesmantavicius et al., 2014; Lussier et al., 1997) que proporcionan pinceladas y pistas sobre la dirección en la que trabajan dichas quinasas. En nuestro laboratorio, también se han llevado a cabo numerosos abordajes en dicha dirección. Por ejemplo, se ha tratado de estudiar la interacción directa entre las proteínas quinasas Hal4 y Hal5 y el sistema de transporte de potasio TRK utilizando varias aproximaciones experimentales, pero sin obtener ningún resultado concluyente.

Ante la dificultad de identificar algún tipo de interacción entre las proteínas quinasas Hal4 y Hal5 con el sistema de transporte de potasio Trk se inició un análisis exhaustivo de los distintos fenotipos del mutante *hal4 hal5*. Con este abordaje se pretendía caracterizar el modo de interacción entre el sistema Trk y Hal4 y Hal5. Estos datos apuntaron hacia la posibilidad de que el mutante *hal4 hal5* está sufriendo un ayuno más generalizado y que su único defecto no sean los bajos niveles intracelulares de

potasio ocasionados por la baja actividad del sistema de transporte de potasio de alta afinidad Trk. Se intentó también encontrar interacciones entre Hal4 y Hal5 y otras proteínas mediante aproximaciones genéticas. Se ensayó la tolerancia a sal mediada por la sobreexpresión de *HAL4* o *HAL5* en varios mutantes. Se realizó también un *screening* genético con bibliotecas de DNA genómico de *S. cerevisiae* y con una biblioteca de cDNA del organismo modelo *A. thaliana* con el fin de encontrar algún gen en éste organismo capaz de rescatar el fenotipo de crecimiento dependiente de KCl del mutante *hal4 hal5*. Los resultados en todos los casos fueron inconcluyentes o negativos.

Los datos presentados a lo largo de la Introducción sugieren que las quinasas Hal4 y Hal5 podrían participar en un mecanismo de regulación dependiente de ubiquitinación y posterior tráfico vesicular a la vacuola de algunos transportadores de la membrana plasmática. Estas quinasas podrían presentar funciones similares en el tráfico a las descritas para otras quinasas de la misma familia y sustrato aguas abajo del complejo TORC1, como la quinasa Npr1. Además, en este sentido se han descrito interacciones entre las quinasas Hal4 y Hal5 y otros efectores de esta ruta de regulación del crecimiento celular, también implicados en el tráfico de permeasas de la membrana plasmática. Por otro lado, el catión K^+ , abundantemente representado en el interior celular y cuya alteración de su concentración intracelular se ha descrito que afecta al crecimiento, podría constituir también una señal de alteración en la actividad del complejo TORC1. En este trabajo, se pretende caracterizar funcionalmente las quinasas Hal4 y Hal5 indagando en los mecanismos de regulación de los transportadores de la membrana plasmática en los que podrían participar estas quinasas, así como establecer si la ruta TOR responde a alteraciones de potasio como se ha descrito que responde a otros componentes básicos celulares.

Objetivos

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

1. Realizar un análisis fisiológico de un mutante de *Saccharomyces cerevisiae* que carece de dos quinasas importantes para la regulación de la homeostasis de potasio, Hal4 y Hal5, con el fin de caracterizar su papel en la toma de nutrientes.
2. Investigar el mecanismo por el cual las quinasas Hal4 y Hal5 regulan el tráfico de transportadores de la membrana plasmática, así como caracterizar su implicación en dicho mecanismo.
3. Estudiar la posible conexión funcional a nivel fisiológico y bioquímico entre la homeostasis de potasio y la ruta de señalización TOR.

Materialles

y Métodos

1. Cultivo y manipulación celular

1.1. Bacterias

Se utilizó la cepa DH5 α de *E. coli* como vehículo para la propagación y el aislamiento de plásmidos. Las células bacterianas se crecieron a 37°C en medio de Luria Bertani (LB) que contiene extracto de levadura al 0.5%, triptona al 1% y NaCl al 1% y que está ajustado a pH 7 con NaOH. Para la preparación de medios sólidos se añadió agar al 2%. Cuando fue necesario para la selección de plásmidos se añadió ampicilina al medio (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$).

1.2. Levaduras

Las cepas de *Saccharomyces cerevisiae* que se han utilizado en este trabajo se muestran en la tabla 2. Las células de levadura se crecieron a 28°C en medio rico YPD (2% glucosa, 2% peptona bacteriológica, 1% extracto de levadura) o en medio mínimo SD (2% glucosa, 0.7% *yeast nitrogen base*, 50 mM ácido succínico ajustado a pH 5.5 con Tris). En el caso del medio mínimo SD se añadieron aminoácidos y bases púricas y pirimidínicas de acuerdo con las necesidades de cada cepa (30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ adenina, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ triptófano, 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ histidina, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ leucina, 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ uracilo y 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ metionina). En algunos casos los medios YPD y SD fueron suplementados con diferentes concentraciones de sales (KCl, LiCl y NaCl). Para los experimentos realizados a pH 4.5 se suplementó el medio YPD con ácido succínico 50 mM y se ajustó el pH a 4.5 con Tris. Para la preparación de medios sólidos se añadió agar al 2%.

Cepa	Información de la cepa	Referencia
BY4741	BY4741 <i>Mata ura3-0 leu2-0 his3-1 met15-0</i>	EUROSCARF
art1	BY4741 <i>art1::KanMX</i>	EUROSCARF
art2	BY4741 <i>art2::KanMX</i>	EUROSCARF
art3	BY4741 <i>art3::KanMX</i>	EUROSCARF
avo2	BY4741 <i>avo2::KanMX</i>	EUROSCARF
bit61	BY4741 <i>bit61::KanMX</i>	EUROSCARF
brp1	BY4741 <i>brp1::KanMX</i>	EUROSCARF
can1	BY4741 <i>can1::KanMX</i>	EUROSCARF
fpr1	BY4741 <i>fpr1::KanMX</i>	EUROSCARF
npr1	BY4741 <i>npr1::KanMX</i>	EUROSCARF
ppz1	BY4741 <i>ppz1::KanMX</i>	EUROSCARF
ptk2	BY4741 <i>ptk2::KanMX</i>	EUROSCARF
tor1	BY4741 <i>tor1::KanMX</i>	EUROSCARF
tco89	BY4741 <i>tco89::KanMX</i>	EUROSCARF
hal4 hal5	BY4741 <i>hal4::KanMX hal5::LEU2</i>	Perez-Valle et al., 2010
trk1 trk2	BY4741 <i>trk1::loxP trk2::loxP</i>	Petrezselyova et al., 2010
THY.AP4	<i>Mata, ura3, leu2,lexA::lacZ::trp1, lexA::HIS3, lexA::ADE2</i>	Paumi et al., 2007
W303-1A	W303-1A <i>Mata ade2-1 can1-100 his3-11,15 leu2,3, 112 trp1-1 ura3-1</i>	Goossens et al., 2000
W303-1A (LEU2, HIS3)	W303-1A <i>Mata ade2-1 can1-100 his3-11,15::HIS3 leu2,3, 112::LEU2 trp1-1 ura3-1</i>	
art1	W303-1B <i>art1::KanMX</i>	
hal4 hal5	W303-1A <i>hal4::LEU2 hal5::HIS3</i>	Mulet et al., 1999
trk1 trk2	W303-1A <i>trk1::LEU2 trk2::HIS3</i>	Mulet et al., 1999
hal4 hal5 art1	W303-1A <i>hal4::LEU2 hal5::HIS3 art1::KanMX</i>	

Tabla 2. Cepas de *S. cerevisiae* utilizadas en este trabajo. En la tabla se describen las cepas de levadura que han sido utilizadas a lo largo de este trabajo. Salvo que se indique en el campo Referencia, las cepas han sido generadas en este trabajo.

1.2.1. Ensayos de crecimiento en medio sólido (goteos)

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

En este trabajo de investigación, para el estudio de diferentes tipos de estrés se prepararon placas de medio mínimo SD o YPD con concentraciones crecientes de rapamicina (un inhibidor de la ruta TOR), L-acetidina-2-ácido carboxílico (AZC) (un análogo tóxico de la prolina) y L-canavanina (un análogo tóxico de la arginina). En el caso del estudio de los efectos de halotolerancia o estrés osmótico se prepararon placas de YPD con diferentes concentraciones de cloruro de litio (25, 50, 100 y 200 mM), sorbitol (0.8 M y 1.2 M) o KCl (0.5 y 1 M). En caso de estudiar el efecto de concentraciones de potasio limitantes se prepararon placas de medio *Translucent* (2%

glucosa, 0.175% yeast nitrogen base (sin aminoácidos, sin sulfato amónico ni K⁺ (Formedium®), 4 g/L de sulfato amónico y 0.13% suplemento Brent, ajustado a pH 5.8 con hidróxido de amonio) con concentraciones crecientes de cloruro de potasio (Navarrete et al., 2010). La selección de transformantes con resistencia a geneticina se llevó a cabo en medio sólido YPD con geneticina (Invitrogen, 50 mg/ml) a una concentración de 200 µg/ml. La selección de células auxótrofas para el uracilo se realizó en medio sólido SD suplementado con ácido 5-fluoroorótico (5-FOA) al 0.2% (p/v) (Thermo).

A continuación se indica en la tabla 3 las características de dichos productos y los tratamientos utilizados:

Producto	Descripción	Proveedor	Disolvente	Fondo genético	Medio	Tratamiento
AZC	Análogo tóxico prolina	Sigma	Agua	BY4741 W303-1A	SD + KCl 100 mM	1, 1.5 y 2 mM
L-Canavanina	Análogo tóxico arginina	Sigma	Agua	BY4741	SD + KCl 50 y 100 mM	0.25 y 1 µg/ml
5-FOA	Intermediario tóxico en cepas que expresan el gen <i>URA3</i>	Thermo	Agua	BY4741	SD + KCl 50 mM	0.2%
Geneticina	Antibiótico aminoglicosídico	Invitrogen		BY4741 W303-1A	YPD	200 µg/ml
KCl (limitante)	Sal formada por K y Cl (1:1)	Merk	Agua	BY4741 W303-1A	<i>Translucent</i>	0, 2.5, 5, 10, 50 y 100 mM
LiCl	Sal formada por Li y Cl (1:1)	Sigma	Agua	BY4741 W303-1A	YPD	25, 50, 100 y 200 mM
Rapamicina (RAP)	Antibiótico Inhibidor TOR	LC Labs	Etanol 90% Tween 20 10%	BY4741 W303-1A	YPD	2,5, 5, 10 y 20 ng/ml

Tabla 3. Tabla resumen de los tratamientos realizados en medio sólido en este trabajo. En la tabla se indican características como: agente empleado, breve descripción, proveedor, solubilidad, fondo genético testado, medio empleado y concentraciones de los productos para los tratamientos realizados. En caso de requerimiento de las cepas el medio SD fue suplementado con KCl 50 ó 100 mM.

1.2.1.1. Evaluación de transformantes por el método de selección con ácido 5-fluoroorótico (5-FOA)

La selección de clones que han perdido el marcador *URA3* se realizó de la siguiente manera. Inicialmente se inocularon precultivos con las cepas de interés BY4741 *hal4 hal5* transformada con el vector pWS93 vacío o pWS93-*NPR1* en medio mínimo suplementado con KCl 50 mM y con todos los aminoácidos de las auxotrofías del fondo genético BY4741 (salvo la leucina), incluido el uracilo. Una vez saturados se inocularon cultivos en medio YPD (DO₆₆₀ 0.1). Se extendieron aproximadamente 10⁵ células de cultivo en fase exponencial (50 µl de cultivo a DO₆₆₀ 0.5) en placas de medio mínimo (con idénticas condiciones al precultivo) suplementadas con 5-FOA al 0.2% (Thermo).

El 5-FOA es utilizado por las células que disponen de la ruta de síntesis de uracilo intacta produciendo un intermedio tóxico que les impide crecer. En este medio únicamente son capaces de crecer aquellas células auxótrofas para el uracilo, es decir, aquellas cepas que hayan perdido el plásmido que lleva el gen marcador *URA3*. Se obtuvieron aproximadamente entre 10-20 colonias de cada transformación a los 7-8 días, desde su inoculación. Posteriormente se analizaron mediante goteos las colonias *ura3⁻* que crecieron en las placas con 5-FOA.

1.2.2. Ensayos de crecimiento en medio líquido

Cultivos líquidos de distintas cepas de levadura crecidas hasta saturación se diluyeron en triplicado a la misma DO_{660} (0.02) en microplacas. La capacidad de crecimiento de estos cultivos de levadura en medio líquido se cuantificó a lo largo del tiempo mediante un analizador Bioscreen C (Thermo LabSystems). Medimos la densidad óptica con un filtro de banda ancha (420-580 nm) para reducir la contribución del medio a la lectura de la absorbancia. La temperatura de crecimiento fue de 28°C y los cultivos fueron sometidos a agitación vigorosa durante los 30 segundos previos a la lectura de la absorbancia. Se realizó una lectura cada 30 minutos durante las 24, 48 ó 72 horas que duró el experimento.

1.2.3. Tratamientos celulares en medio líquido

Para los ensayos con concentraciones limitantes de KCl, las cepas indicadas se cultivaron en SD suplementado con KCl 0.1 M hasta fase logarítmica. Tras lavar dos veces con agua *Milli-Q* estéril, las células se recuperaron por centrifugación (5 minutos, 1500 *g*) y se cultivaron de nuevo en medio SD (sin suplemento de KCl) durante diferentes tiempos en función del ensayo. Para el análisis de la estabilidad en la membrana plasmática de distintos transportadores, ante concentraciones limitantes de KCl, se emplearon tiempos largos de al menos 90 minutos (hasta 240 minutos). En el estudio de la regulación endocítica, las células fueron sometidas a concentraciones limitantes de KCl durante 30 minutos. Además se suplementó el medio con una concentración final de 0.5 mg/ml del inhibidor de la endocitosis Latrunculina A (LatA). En el caso del ayuno de metionina, en primer lugar las células fueron cultivadas en medio SCD (medio mínimo complementado con vitaminas y aminoácidos) suplementado con KCl 0.1 M. Una vez en fase exponencial y tras dos lavados con agua *Milli-Q* estéril se cultivaron las células en medio SD (sin suplemento de KCl) y paralelamente en medio SD con KCl 0.1 M durante 120 minutos.

En el resto de tratamientos en medio mínimo con KCl 0.1 M, las células fueron tratadas con distintos aminoácidos como arginina (0,02 mg/ml), ácido aspártico (300 µg/ml) o metionina (20 µg/ml). En los tratamientos con metionina de células del fondo genético

BY4741, las células fueron cultivadas en medio SCD hasta fase exponencial, lavadas dos veces con agua *Milli-Q* estéril e incubadas durante 4 horas en medio mínimo SD. Transcurrido dicho tiempo se hizo un tratamiento con metionina, a una concentración final de 20 µg/ml, durante 30 minutos. Tanto el medio SCD como el SD fue suplementado con KCl 0.1 M.

Los tratamientos de ayuno de potasio fueron realizados en medio *Translucent*. Las células en fase exponencial fueron recuperadas por filtración o centrifugación y transferidas a medio *Translucent* con y sin suplemento de KCl 50 mM. Los tiempos de ayuno variaron en función de la proteína de estudio.

También se trataron las células con otros agentes como el antibiótico rapamicina (RAP) o el inhibidor de la traducción cicloheximida (CHX), a unas concentraciones finales de 200 ng/ml y 25 µg/ml, respectivamente. En este caso también las células fueron cultivadas en SD suplementado con KCl 0.1 M o en medio *Translucent* con KCl 50 mM.

En la tabla 4, se muestra un resumen de los tratamientos realizados clasificados por la proteína de estudio e indicando diferentes características del tratamiento como: medio empleado, tiempos de tratamiento aplicados, fondo genético etc.

Proteína estudio	Tratamiento (I _{final})	Descripción	Proveedor	Solubilidad	Fondo genético	Medio	Tiempo (minutos)
Mup1	KCl limitante				W303-1A	SD	0 y 120
Mup1	KCl limitante + Latrunculina A 0.5 mg/ml	Inhibidor endocitosis	Sigma	DMSO	W303-1A	SD	0 y 30
Mup1	Metionina 20 µg/ml	Aminoácido	Sigma	Agua	W303-1A	SD	0 y 30
Mup1	Ayuno Metionina				BY4741	SCD	0 y 240
Mup1	Rapamicina 200 ng/ml	Antibiótico	LC Labs	Etanol 90% Tween 20 10%	W303-1A	SD	0 y 45
Can1	KCl limitante				W303-1A	SD	0 y 120
Can1	Arginina 0.02 mg/ml	Aminoácido	Sigma	Agua	W303-1A	SD	0, 30, 60 y 120
Can1	SCD	Medio SD con vitaminas y aminoácidos			W303-1A	SCD	D0 0.5
Trk1	KCl limitante					SD	0 y 120
Dip5	KCl limitante				W303-1A BY4741	SD	0, 45, 90 y 120
Dip5	Ácido aspártico 300 µg/ml	Aminoácido	Sigma	Agua	W303-1A BY4741	SD	0 y 45
Dip5	Rapamicina 200 ng/ml	Antibiótico	LC Labs	Etanol 90% Tween 20 10%	W303-1A BY4741	SD	0 y 45
Npr1	KCl limitante Ayuno de KCl				W303-1A BY4741	SD <i>Translucent</i>	0 y 30
Npr1	Rapamicina 200 ng/ml	Antibiótico	LC Labs	Etanol 90% Tween 20 10%	W303-1A BY4741	SD <i>Translucent</i>	0 y 30
Npr1	Cicloheximida 25 µg/ml	Inhibidor síntesis proteínas	Applichem	Agua	W303-1A BY4741	<i>Translucent</i>	0 y 30
Atg8	Ayuno de KCl				W303-1A	<i>Translucent</i> 10 mM	0, 60 y 180
Atg8	Rapamicina 200 ng/ml	Antibiótico	LC Labs	Etanol 90% Tween 20 10%	W303-1A	YPD	0 y 15
Sch9	Ayuno de KCl				W303-1A BY4741	<i>Translucent</i>	0 y 30
Sch9	Rapamicina 200 ng/ml	Antibiótico	LC Labs	Etanol 90% Tween 20 10%	W303-1A BY4741	<i>Translucent</i>	0 y 30
Sch9	Cicloheximida 25 µg/ml	Inhibidor síntesis proteínas	Applichem	Agua	W303-1A BY4741	<i>Translucent</i>	0 y 30
Ypk1	Ayuno de KCl				W303-1A BY4741	<i>Translucent</i>	0 y 30
Ypk1	Rapamicina 200 ng/ml	Antibiótico	LC Labs	Etanol 90% Tween 20 10%	W303-1A BY4741	<i>Translucent</i>	0 y 30
Ypk1	Cicloheximida 25 µg/ml	Inhibidor síntesis proteínas	Applichem	Agua	W303-1A BY4741	<i>Translucent</i>	0 y 30

Tabla 4. Tabla resumen de los tratamientos realizados en medio líquido en este trabajo en función de la proteína de estudio. En la tabla se indican características como: proteína de estudio, nombre del tratamiento, breve descripción del tratamiento, proveedor del compuesto, solubilidad del compuesto, fondo genético testado, medio de cultivo inicial y tiempos de los tratamientos realizados. Las proteínas estudiadas, así como los tratamientos, se muestran en orden de aparición en este trabajo de Tesis Doctoral. Los medios SD y *Translucent* fueron inicialmente suplementados con KCl 100 y 50 mM respectivamente, salvo que se indique otra concentración. Los tratamientos nombrados como “KCl limitante” hacen referencia a cultivos en medio SD sin suplemento de potasio. Los tratamientos de “ayuno de KCl” se refieren a los tratamientos realizados en medio *Translucent*.

2. Técnicas de transferencia génica

2.1. Transformación en bacteria

Para la transformación bacteriana se empleó un protocolo estándar de transformación por choque térmico (Hanahan, 1986). Se mezclaron entre 0.1 y 1 ng de plásmido con 100 μ l de células competentes de *Escherichia coli* (cepa DH5 α). Después de incubar la mezcla durante 30 minutos en hielo, se calentó a 42°C durante 1 minuto y seguidamente se volvió a poner en hielo durante 1 minuto más. Se añadieron 600 μ l de medio LB y se incubaron a 37°C durante 45 minutos. Por último se extendieron las células en placas de LB con antibiótico para la selección de las células transformadas.

2.2. Transformación simple en levadura

Para las transformaciones en levadura se empleó una variación del protocolo estándar de transformación con acetato de litio. Las células de levadura (recientemente crecidas en medio YPD sólido durante 24 horas) se mezclaron con entre 0.1 y 10 μ g de DNA exógeno, 5 μ l de una solución de DNA monocatenario de esperma de salmón (0.1%) y 500 μ l de solución PLATE (40% PEG-4000 (p/v), 100 mM acetato de litio (LiAc), 10 mM Tris pH 7.5, 0.4 mM EDTA). Después de permanecer durante un mínimo de 16 horas a temperatura ambiente, la mezcla se incubó a 42°C durante 15 minutos y posteriormente se recogieron las células por centrifugación (durante 2 minutos a 13000 rpm). Finalmente las células se resuspendieron en 200 μ l de agua *Milli-Q* estéril y se extendieron en placas de medio selectivo.

2.3. Transformación de alta eficiencia en levadura

En el caso de generación de plásmidos por recombinación homóloga o de generación de cepas mutantes, se utilizó un método de transformación de alta eficiencia. En estos casos la transformación en levadura se llevó a cabo por el protocolo del acetato de litio (Ito et al., 1983). La cepa de levadura diana de transformación se cultivó en 10 ml de YPD hasta alcanzar una DO_{660} entre 0.4 - 0.6. Tras centrifugar 5 minutos a 1500 *g*, las células se resuspendieron en 1/10 del volumen inicial del cultivo con tampón TE-LiAc (0.1 M acetato de litio pH 7.5, 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA 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 μ l de células en tampón TE-LiAc se les añadió 2 μ l de DNA de esperma de salmón al 1% (Sigma), 3 μ l (1-10 μ g) de cada plásmido o fragmento de PCR a transformar y 300 μ l de PEG TE-LiAc [tampón TE-LiAc al que se le añadió PEG al 40% (p/v)]. Tras una incubación de 30 minutos a 28°C y un posterior choque térmico de 20 minutos a 42°C, las células que fueron centrifugadas y

resuspendidas en agua *Milli-Q* estéril, se sembraron en medio selectivo. En el caso de transformación de levadura con un casete que contiene el gen de resistencia a kanamicina, se realizó un paso previo a la siembra en el que las células transformadas se incubaron a 30 °C durante 45 minutos. Finalmente las placas se incubaron durante 3 días a 30 °C.

3. Técnicas de manipulación genética

3.1. Extracción de plásmidos en *E. coli* y *S. cerevisiae*

Para la extracción y purificación de plásmidos en *E. coli*, se empleó un protocolo de aislamiento de plásmidos de alta pureza de *Roche Applied Science* siguiendo las indicaciones del fabricante.

Para la extracción de plásmido de levadura se crecieron 3 ml de la cepa de interés en medio selectivo hasta saturación. Las células se recogieron por centrifugación (13000 rpm, durante 2 minutos) y se resuspendieron en 200 µl de tampón de lisis (10 mM Tris-HCl pH 8, 1 mM EDTA, 100 mM NaCl, 1% SDS, 2% Triton X-100). Tras añadir 200 µl de fenol-cloroformo-isoamílico (25:24:1) y aproximadamente 500 µl de bolas de vidrio de 0.5 mm de diámetro, las células se lisaron por agitación utilizando un agitador automático durante 10 minutos. Posteriormente se añadió a la mezcla 200 µl de tampón TE (10 mM Tris-HCl pH 8, 1 mM EDTA) y se volvió a mezclar por agitación durante 1 minuto más. Los microtubos se centrifugaron durante 3 minutos a 13000 rpm y se pasó la fase acuosa superior (aproximadamente 350 µl) a un microtubo nuevo. Tras precipitar y lavar el DNA con etanol absoluto y etanol 70% (v/v), respectivamente, una vez el precipitado estaba seco, se resuspendió en 20 µl de TE.

3.2. Generación de plásmidos

Para la generación del plásmido pWS93-*NPR1* se amplificó un fragmento de PCR *SmaI/SalI* correspondiente a la secuencia codificante de *NPR1* a partir de DNA del fondo genético W303-1A empleando el oligonucleótido directo 5'ATATACCCCGGAATGTCTTCATTA ACTCGATTGC3' y el oligonucleótido reverso 5'ATAGTCGACTTATTGATTATTTGCTTTTCTTT3' y para la generación del plásmido pBTM116-*MUP1-NT* se amplificó un fragmento de PCR *EcoRI/SalI* correspondiente a las 180 pares de bases (pb) del extremo N-terminal del gen *MUP1* empleándose el oligonucleótido directo 5'ATAGAATTCATGTCGGAAGGAAGAACGTT3' y el oligonucleótido reverso 5'ATAGTCGACTTACTGCTTTTCACCTTGGTCCA3'. Los sitios de restricción *SmaI/SalI* y *EcoRI/SalI*, respectivamente, se indican en negrita. Ambos

fragmentos fueron subclonados en el vector pGEM *T-easy* (plásmido de clonación comercial de Promega Corp) y posteriormente en el vector multicopia pWS93 (previamente digerido con las enzimas de restricción *SmaI/SalI*) o pBTM116 (previamente digerido con las enzimas de restricción *EcoRI/SalI*). El plásmido pWS93 es multicopia, está bajo el control del promotor ADH, contiene el gen *URA3* para su selección y la etiqueta HA (Song and Carlson, 1998). El plásmido pBTM116 que contiene el gen *TRP1* se empleó para generar las proteínas de fusión con LexA (Vojtek, 1997). Con la misma estrategia se generó el plásmido pBTM116-*NPR1*.

El plásmido empleado en este trabajo de investigación para los ensayos de fosforilación de Npr1 se generó a partir del plásmido pRS415-*promNPR1-NPR1-3xHA* cedido por el doctor Jason MacGurn, en el cual se reemplazó por recombinación homóloga el gen marcador de *LEU2* por el gen *URA3*. Esta estrategia de recombinación también se empleó para reemplazar el gen marcador *URA3* por el gen marcador *TRP1* y *HIS3* en el plásmido pRS416-*MUP1-GFP*. En este caso, por un lado se digirió el vector original pRS416-*MUP1-GFP* con la enzima de restricción *StuI*, una enzima que permite linearizar el vector tras su único corte en el gen *URA3*. Por otro lado, se amplificó por PCR el gen *TRP1* con los sitios de recombinación homóloga del vector pRS416 con los oligonucleótidos directo

5'**CAGATTGTA**CTGAGAGTGCACCATA**CCACAGCTTTTCAAT**GAGAGTGCACCATAAACGACC3' y
reverso

5'**TTTCTCCTTACGCATCTGTGCGGTATTTACACCGCATA**AAGGCAAGTGCACAAACAATAC3'

y el gen *HIS3* con los sitios de recombinación homóloga del vector pRS416, con los oligonucleótidos directo

5'**CAGATTGTA**CTGAGAGTGCACCATA**CCACAGCTTTTCAAT**CTAGTACACTCTATATTTTTTTATG3' y
reverso

5'**TTTCTCCTTACGCATCTGTGCGGTATTTACACCGCATA**AGGGTAATATCGAGTTCAAGAGAAAAAAA
AAG3'. Los sitios de recombinación del vector se indican en negrita. Posteriormente se realizó el método de transformación de alta eficiencia en levadura para su recombinación homóloga.

Los plásmidos pACTII-*ART1*, pACTII-*ART2*, pACTII-*ART3*, pACTII-*ART4*, pACTII-*ART5*, pACTII-*ART6*, pACTII-*ART7*, pACTII-*ART8* y pACTII-*ART9* se utilizaron para los ensayos de doble híbrido. Estos plásmidos derivan del vector pACTII (ClonTech), un vector que contiene el gen de selección en levadura *LEU2*, un dominio de activación y el epítipo HA. Para la generación de estos plásmidos se amplificaron, usando DNA genómico del fondo genético W303-1A, los fragmentos de PCR (desde el codón ATG hasta el codón de parada): (*SmaI/SmaI*) correspondiente a la región codificante de *ART1*, (*SmaI/SalI*) correspondientes a la región codificante de *ART2*, *ART3* y *ART4*, (*SmaI/SfiI*) correspondientes a la región codificante de *ART5*, *ART6*, *ART7* y *ART8* y (*SmaI/BamHI*) correspondiente a la región codificante de *ART9*. Los fragmentos amplificados fueron

subclonados en el vector pCR2.1 o pGEM *T-easy* y posteriormente en el vector pACTII (previamente digerido con las combinaciones de enzimas de restricción SmaI/SmaI, SmaI/SalI, SmaI/SfiI o SmaI/BamHI) para obtener los plásmidos de expresión de bacteria y levadura, respectivamente. En la tabla 5 se indican los oligonucleótidos empleados para la generación de estos plásmidos.

Gen diana	Enzima restricción	Oligonucleótidos
ART1	SmaI SmaI	Directo 5'ATATTAT CCCGGG GATGGCATTTCACGTC3' Reverso 5'ATATAAT CCCGGG ACTACTGGTTATTCTA3'
ART2	SmaI SalI	5'ATATAT CCCGGG CATGCCGTTTATAACAT3' Reverso 5'ATATTAG TCGAC CTCATTCTTCATCACTC3'
ART3	SmaI SalI	Directo 5'ATATAT CCCGGG CATGCCCATGGACCAATCTATC3' Reverso 5'ATATTAG TCGAC CTAAAGGGTACTCTCATTTATAC3'
ART4	SmaI SalI	Directo 5'ATATAT CCCGGG CATGTTTTCATCATCAT3' Reverso 5'ATATTAG TCGAC CCCTATGAGCGATCCCGT3'
ART5	SfiI XhoI	Directo 5'ATGGCCATGGAGGCCATGTTTTCACTTAGTTTCGCTAT3' Reverso 5'ATAACTCGAGATTCAGTCATCGTCGAGTAAG3'
ART6	SfiI XhoI	Directo 5'ATGGCCATGGAGGCCATGCTCCAATCAATACAGAAA3' Reverso 5'ATAACTCGAGATTTATTTTCTTTTCGCGAAATG3'
ART7	SfiI XhoI	Directo ATGGCCATGGAGGCCATGGGCTTCAGTAGCGGTA3' Reverso 5'TATACTCGAGATCTATCGTTTGTTACCCTTTGA3'
ART8	SfiI XhoI	Directo 5'ATGGCCATGGAGGCCATGCAATCTACTGTCCCAATA3' Reverso 5'ATAACTCGAGATTTATGATGAAATCTCGTCATATC3'
ART9	SfiI BamHI	Directo 5'ATGGCCATGGAGGCCATGTCGTTACTGAGACTGTG3' Reverso 5'ATAAGGATCCAATTAATAGTCATCACAAAGGGG3'

Tabla 5. Oligonucleótidos empleados para la amplificación de los genes **ART1**, **ART2**, **ART3**, **ART4**, **ART5**, **ART6**, **ART7**, **ART8** y **ART9**. Se muestra la diana de restricción insertada en el extremo 5' del oligonucleótido, en cada caso, resaltada en negrita.

La generación del plásmido pICTrp-*DIP5*-V5 se realizó amplificando por PCR la secuencia codificante del gen *DIP5* (SfiI/SfiI) empleando el oligonucleótido directo 5' TATATAGGCCATTACGGCCAAGATGCCTCTAAAGAAGATG3' y el oligonucleótido reverso 5'ATATATGGCCGAGGCGGCCGCGAAGATATTACCAAAAATTTTC3' e insertando este de forma direccional en el vector pICTrp (DualSystems), que es un vector multicopia que

posee el promotor inducible por cobre *CUP1* y el gen marcador *URA3*. Los sitios Sfil se indican en negrita.

En todos los casos, 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).

Todos los plásmidos generados en esta Tesis Doctoral han sido comprobados utilizando el servicio de secuenciación del IBMCP.

Los siguientes plásmidos fueron amablemente cedidos por el profesor Hiroshi Takagi: pRS416, pRS416-8xHis-RSP5, pRS416-8xHis-RSP5^{T357A} y pRS416-8xHis-RSP5^{T357D} (centroméricos y con marcador *URA3*) (Sasaki and Takagi, 2013). El profesor Tatsuya Maeda (Universidad de Tokio, Japón) nos cedió los plásmidos pRK219-DIP5-EGFP (Hatakeyama et al., 2010), pMY22-TOR1_{WT} y pMY28-TOR1_{LM} (Kingsbury et al., 2014). Los plásmidos pRS416-MUP1-GFP y pRS415-proNPR1-NPR1-3xHA fueron proporcionados por el Dr. Jason MacGurn del laboratorio del Dr. Scott D. Emr de la Universidad de Cornell (EEUU) (Teis et al., 2008; MacGurn et al., 2011), mientras que el plásmido pVTU100-CAN1-GFP (multicopia, marcador *URA3* y promotor ADH) nos lo proporcionó el profesor Widmar Tanner (Universidad de Regensburg, Alemania) (Grossmann et al., 2006). El profesor Jodi Nunnari nos proporcionó el plásmido pRS416-GFP-ATG8 (centromérico, con promotor endógeno). La profesora Amparo Pascual Ahuir de la Universidad Politécnica de Valencia nos cedió los plásmidos centroméricos pRS416-SCH9, pRS416-SCH9_{K441A} y pRS416-SCH9_{D556T} (Pascual-Ahuir and Proft, 2007) y la profesora Emilia Matallana de la Universidad de Valencia nos cedió el plásmido pRS411 (centromérico, *MET15*).

El resto de plásmidos empleados en este trabajo de investigación como son los plásmidos pBTM116-HAL4 (2μ, con marcador *TRP1*, dominio de unión al DNA LexA), pRS414-TRK1-HA (centromérico, marcador *TRP1*) y pUN95-TRK1-GFP (centromérico, marcador *HIS3*), estaban disponibles en el laboratorio.

3.3. Generación de la cepa mutante *hal4 hal5 art1*

Para construir la cepa mutante *hal4 hal5 art1* se empleó el método de PCR-KanMX. Los oligonucleótidos empleados para la amplificación del casete de disrupción de *ART1* usando como molde DNA genómico de la cepa BY7471 *art1::KanMX* fueron el oligonucleótido directo 5'TAAGGTTGATTAAGTTTGTGTGC3' y el oligonucleótido reverso 5'CGAAATGAAGATTAATCCAGTC3'. Estos añaden los sitios de recombinación homóloga 200 pb aguas arriba y 200 pb aguas abajo del ORF delecionado. De esta forma se hizo la disrupción por recombinación homóloga del alelo completo *ART1* de la cepa haploide W303-1A *hal4::LEU2 hal5::HIS3* (Mulet et al., 1999).

La presencia de los casetes de disrupción en colonias transformantes se evaluó por asociación de fenotipos (crecimiento en placas de YPD con geneticina y en SD sin histidina, sin leucina y suplementado con KCl 0.1 M y los aminoácidos de las auxotrofías). Las colonias que se seleccionaron fueron aquellas que pudieron crecer gracias a la inserción de los marcadores de selección *KanMX*, *LEU2* y *HIS3*. Las inserciones génicas también se comprobaron por PCR de DNA genómico. Para comprobar si había tenido lugar la inserción en el lugar correcto del genoma por sustitución de la secuencia *ART1* por el casete *KanMX* se emplearon los oligonucleótidos: 5'TATCATAGGCAGTTTTTACTAGG3' que hibrida 250 pb aguas arriba del codón de inicio del gen *ART1* y 5'CTGCAGCGAGGAGCCGTAAT3' que hibrida dentro del marcador de selección *KanMX*. Si el casete se ha insertado en el lugar correcto se obtendrá un producto de PCR en cepas con la inserción correcta.

También se realizó un análisis *Northern blot* para confirmar estas inserciones génicas.

4. Técnicas de detección de moléculas de RNA o *Northern blot*

4.1. Extracción y electroforesis de RNA total de levadura

Los extractos de RNA total de levadura se obtuvieron a partir de 50 ml (10^7 células /ml) de cultivos en fase exponencial. Las células se recogieron por centrifugación (3000 *g* durante 5 minutos) y se guardaron congeladas a -80°C hasta su uso.

Para el aislamiento del RNA total se resuspendieron las células en 150 μl de TCES (0.2 M Tris, 0.2 M NaCl, 50 mM EDTA, 2% SDS ajustado a pH 8 y estéril). A continuación se les añadió 150 μl de fenol-cloroformo-isoamílico (25:24:1) y aproximadamente 500 μl de bolas de vidrio de 0.5 mm de diámetro. Las células se lisaron por agitación utilizando un agitador automático durante 2 minutos. Posteriormente se añadió a la mezcla 200 μl más de TCES y se volvió a mezclar por agitación. Esta mezcla se centrifugó durante 3 minutos a 13000 rpm, y se pasó la fase superior a microtubos nuevos. Se añadió a cada microtubo 300 μl de fenol-cloroformo-isoamílico (25:24:1), se mezcló por agitación y volvieron a centrifugarse los microtubos (3 minutos a 13000 rpm). Se pasó la fase superior a microtubos nuevos y se precipitó con 750 μl de etanol absoluto a -80°C . El RNA recogido por centrifugación (a 13000 rpm durante 10 minutos a 4°C) se lavó con etanol frío al 70% (v/v) y se centrifugó de nuevo. Posteriormente se secó el precipitado. Las muestras se resuspendieron en 30 μl de agua *Milli-Q* libre de RNAsas y se mantuvieron en agitación durante 10 minutos. Las muestras de RNA se cuantificaron mediante un espectrofotómetro Nanodrop ND-1000 y se congelaron a -20°C hasta su uso.

Para el análisis por *Northern blot* se separaron 20 μg de RNA total, para cada una de las

muestras, en una electroforesis en gel de agarosa al 1% con un 2.2% de formaldehído. A las muestras, antes de ser cargadas en el gel, se les añadió 16 µl de tampón de carga 1.25X. Se calentaron durante 10 minutos a 56°C para romper las estructuras secundarias del RNA. Se llevó a cabo la electroforesis durante unas 2-3 horas a 80 V. La visualización mediante luz ultravioleta permitió detectar dos bandas de 3.5 kb y 1.8 kb que se corresponden con los RNA ribosomales (subunidad mayor y subunidad menor) y que a su vez nos permitieron comprobar si la carga entre muestras estaba igualada y no había degradación del RNA en ellas.

Tampón de carga 1.25X		Solución MAE 10X	
Formamida desionizada	2.2 ml	MOPS 0,2 M pH 7	
Formaldehído 37%	0.8 ml	NaAc 50 mM	
MAE 10X	0.5 ml	EDTA 10mM	
Glicerol 80%	0.4 ml		
Azul bromofenol 2%	0.1 ml		
Bromuro etidio 0.1%	1µl		

4.2. Transferencia del RNA a membrana

El gel de RNA fue preincubado con un exceso de tampón de incubación SSC 10X (1.5 M NaCl, 0.15 M Citrato trisódico ajustado a pH 7 con HCl 1 M) durante al menos 20 minutos para eliminar el formaldehído. Después se realizó el montaje para la transferencia por capilaridad de los RNAs a membrana de nailon (Hybond-N, Amersham). Se dejó transfiriendo toda la noche. Al día siguiente se procedió a la fijación covalente del RNA a la membrana de nailon utilizando *UV Stratalinker* (Stratagene) que dosifica la luz ultravioleta adecuada y por lo tanto mejora la unión inicial débil entre RNA y el filtro de membrana. Se determinó una dosis óptima de 0.12 J de luz a 254 nm durante 1 minuto. Los filtros de membrana se conservaron a temperatura ambiente hasta su uso.

4.3. Obtención, purificación y marcaje radiactivo de fragmentos (sondas) de DNA

Mediante PCR se amplificaron fragmentos de DNA que cubrían entre 300-900 pb del *ORF* de los genes a estudiar. La lista completa de oligonucleótidos empleados, su secuencia y posición dentro del gen correspondiente puede consultarse en la tabla 6 que se muestra a continuación. La correcta amplificación y tamaño de los fragmentos de DNA obtenidos por PCR se comprobó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%. Se purificó el DNA sonda con el kit de purificación *GENECLEAN TURBO* (MP Biomedicals) y se cuantificó su concentración.

El marcaje radioactivo de las sondas de DNA se realizó mediante la técnica de marcaje con oligonucleótidos al azar como cebadores empleando el sistema *High Prime*

(Roche). Este contiene oligonucleótidos al azar, dATP, dGTP y dTTP y el fragmento Klenow de la DNA polimerasa. Se marcaron los fragmentos de DNA (sondas) (25-100 ng) con dCTP [α - 32 P] según las instrucciones del fabricante.

Oligonucleótido	Secuencia 5'-3'	Descripción
ACT1-1	ATTGAACACGGTATTGTCACCAAC	+518 pb en el ORF de ACT1
ACT1-2	CCTTACGGACATCGACATCACAC	+1182 pb en el ORF de ACT1
NPR1-1	ATATACCCGGGAATGTCTTCATTAACCTCGATTGC	+1 pb en el ORF de NPR1
NPR1-2	GTGGTTCCACGCTATCTAC	+658 pb en el ORF de NPR1

Tabla 6. Oligonucleótidos empleados en este trabajo para la generación de sondas. En la tabla se indican los oligonucleótidos empleados así como su secuencia y posición dentro del gen correspondiente.

4.4. Hibridación de las membranas con la sonda radioactiva y cuantificación de la señal

Previamente a la hibridación, se sometió a la membrana a una pre-hibridación de 10 minutos a 65°C con 10 ml del tampón de hibridación PSE para evitar posteriores hibridaciones inespecíficas. Después se procedió a la hibridación de la membrana con la sonda recién marcada en 10 ml de tampón PSE a 65°C durante toda la noche. Las membranas se lavaron dos veces con tampón de lavado 4X SSC-0.1% SDS (10 minutos cada vez cambiando el tampón) y una última vez con 0.4X SSC-0.1% SDS (durante otros 10 minutos). Una vez limpias se sellaron con plástico Saran Wrap para proceder a la exposición en un *Hypercassette*[™] (Amersham Biosciences) con pantalla intensificadora. La duración de la exposición por autorradiografía dependió de la intensidad de la hibridación obtenida y estuvo comprendida entre 3 h y varios días a -80°C. La señal radiactiva se detectó mediante películas Fuji RX.

Tampón hibridación PSE	
NaPO ₃ 1 M pH 7.2	3 ml
10% SDS	7 ml
EDTA 0.5 M	20 μ l

La cuantificación de la señal se realizó exponiendo los filtros en una pantalla *Fujifilm BAS-1500 Phosphoimager* (fue suficiente la mitad de tiempo de exposición respecto a una película) a temperatura ambiente. La imagen obtenida se cuantificó mediante un lector *Fujifilm FLA5100*[™] utilizando el programa *Fujifilm Image Reader* y se procedió a la cuantificación mediante el *software Image Gauge v. 4.0* de *Fujifilm*.

En algunos casos, los filtros (todavía húmedos) fueron reutilizados al menos una vez más eliminando previamente la sonda radiactiva hibridada. Para ello se incubó el filtro en una solución 0.1% SDS a 100°C, dejando enfriar la solución hasta alcanzar la temperatura ambiente.

5. Ensayos de Doble Híbrido

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

Se cotransformó la cepa THY.AP4 con dos quimeras, una que posee el dominio de unión al DNA (proteínas LexA) fusionada a la proteína X (plásmido pBTM116) (*HAL4*, *NPR1* y *MUP1-NT*) y la otra que posee el dominio de activación (Gal4 de levadura) fusionado a la proteína Y (plásmido pACT2) (*ART1-ART9*). Si las proteínas de fusión interactúan, los dominios de activación y de unión se aproximan de tal forma que pueden activar la transcripción de genes reporteros.

Para estudiar la posibilidad de interacción se realizaron ensayos de crecimiento en medio sólido carente de histidina y/o adenina, que son las rutas biosintéticas que incorpora la cepa THY.AP4.

6. Obtención de extractos proteicos

6.1. Obtención de extractos proteicos de células enteras (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, 5 minutos). Las células se resuspendieron en 50 μ l de tampón de carga Laemmli 2.5X (3.8% SDS, 0,05 M dithioeritritol, 5 mM EDTA, 15% sacarosa, 0,125 mg/ml azul de bromofenol, 0.15 M Tris-HCl ajustado a pH 6.8) y se incubaron a 95°C durante 5 minutos.

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

Para la obtención de extractos proteicos de las fracciones soluble e insoluble (fraccionamiento celular) se recogieron 10 ml de células en fase logarítmica mediante centrifugación (1500 *g* durante 5 minutos). Se resuspendieron en 300 μ l de tampón de fraccionamiento (50 mM Tris-HCl pH7.6, 0.1 M KCl, 5 mM EDTA, 5 mM DTE, 20% sacarosa, inhibidores de proteasas (1 pastilla de inhibidor *Complete*, Roche)/10 ml tampón) y se rompieron por agitación en presencia de bolas de vidrio de 0.5 mm de diámetro. Seguidamente se añadieron 200 μ l más de tampón de fraccionamiento y se centrifugaron para eliminar los restos celulares (400 *g* durante 5 minutos a 4°C). El

sobrenadante se transfirió a un nuevo microtubo 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 50 µl de tampón de carga Laemmli 2.5X (3.8% SDS, 0.05 M dithioeritritol, 5 mM EDTA, 15% sacarosa, 0.125 mg/ml azul de bromofenol, 0.15 M Tris HCl ajustado a pH 6.8). Por otro lado, se tomaron 40 µl del sobrenadante que posee las proteínas de la fracción soluble y se le añadieron 10 µl de tampón de carga Laemmli 5X. Las fracciones soluble e insoluble se calentaron a 65°C y 37°C, respectivamente, antes de cargarse en gel de poliacrilamida para su electroforesis.

7. Técnicas de inmunodetección de proteínas o *Western blot*

7.1. Electroforesis de proteínas y transferencia a membrana

La separación de proteínas mediante electroforesis se llevó a cabo en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) empleando el sistema MiniProtean 3 (BioRad). Estos geles constan de una zona superior de empaquetamiento (6% acrilamida:bisacrilamida 30:0.8, 125 mM Tris-HCl pH 6.8 y 0.1% SDS) y una zona inferior de separación (8% acrilamida:bisacrilamida 30:0.8, 375 mM Tris-HCl pH 8.8 y 0.1% SDS). El tampón de resolución empleado fue SDS-PAGE 1X (0.19 M glicina, 0.1% SDS, pH ajustado a 8.3 con Tris). La primera parte de la electroforesis (empaquetamiento) se realizó a una diferencia de potencial de 80 V mientras que la segunda parte (resolución) se realizó bajo una diferencia de potencial de 120 V.

Una vez separadas las proteínas por electroforesis, se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (Millipore). Para la transferencia se utilizó el set Mini-Trans Blot (BioRad) y el tampón de transferencia TOWBIN (0.19 M glicina, 0.01% SDS y 20% metanol, ajustando el pH a 8.3 con Tris). La transferencia se realizó bajo una diferencia de potencial constante de 100 V durante 1.5 horas, a una temperatura de 4°C.

Con el objetivo de comprobar la eficiencia de la transferencia y como control interno de carga se realizó la tinción de la membrana empleando indistintamente dos tipos de soluciones colorantes: *Direct Blue* o tinción *Ponceau S*. Para la tinción con *Direct Blue* (Aldrich Chemistry) se sumergieron las membranas en la solución colorante (0.008% [p/v] DB71) durante 2 minutos en agitación. A continuación, se eliminó el exceso de colorante por medio de la Solución de Lavado de *Direct Blue* (40% etanol absoluto (v/v) y 10% ácido acético glacial (v/v)). Tras capturar la imagen de la membrana teñida, se eliminó el colorante con la Solución Decolorante de *Direct Blue* (50% de etanol absoluto, 1 M bicarbonato sódico (NaHCO₃)). Alternativamente, la tinción de la

membrana se llevó a cabo con la solución colorante *Ponceau S* (0.1% *Ponceau S* (Sigma), 1% ácido acético) durante 2 minutos en agitación. El exceso de colorante se eliminó lavando con agua *Milli-Q*. Posteriormente se capturó la imagen.

7.2. Inmunodetección de proteínas transferidas a membrana

Para la detección de las proteínas a analizar, en primer lugar se bloquearon los sitios de unión no específicos de la membrana sumergiéndola en la solución de bloqueo (0.1% Tween 20, 150 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl pH 7.6 y 2% de leche desnatada) durante 30 minutos en agitación. Seguidamente se retiró la solución de bloqueo y se añadió el anticuerpo primario a una dilución específica para cada caso (Tabla 7). Se dejó incubando durante 16 horas a 4°C en agitación. Tras 3 lavados de 10 minutos en TBS-Tween 20 (0.1% Tween 20, 150 mM NaCl y 20 mM Tris-HCl pH 7.6) se añadió el anticuerpo secundario específico en la dilución adecuada (Tabla 7) y se dejó incubando durante un tiempo mínimo de 1 hora en agitación. Finalizada la incubación, se realizaron 3 lavados de 10 minutos en TBS-Tween 20 para retirar el exceso de anticuerpo secundario.

Anticuerpo primario	Dilución	Proveedor	Anticuerpo secundario	Dilución	Proveedor
α -GFP	1:10000	Roche	α -HRP-Mouse	1:10000	Amersham
α -HA	1:5000	Covance	α -HRP-Mouse	1:5000	Amersham
α -LexA	1:20000	Abcam	α -HRP-Rabbit	1:10000	Amersham
α -V5	1:5000	Roche	α -HRP-Mouse	1:5000	Amersham
α -Pma1	1:20000	Home made (R. Serrano)	α -HRP-Rabbit	1:5000	Amersham
α -Sch9 _{PS758}	1:25000	Home made (R. Loewith)	IRDye® 680RD Donkey α -Rabbit IgG	1:10000	LI-COR
α -Sch9 _{TOTAL}	1:25000	Home made (R. Loewith)	IRDye® 680RD Goat α -Rabbit IgG	1:10000	LI-COR
α -Ypk1 _{PT662}	1:500	(Berchtold et al., 2012)	IRDye® 680RD Donkey α -Mouse IgG	1:1000	LI-COR
α -Ypk1 _{TOTAL}	1:1000	SC-12051 (Santa Cruz)	IRDye® 800CW Donkey α -Goat IgG	1:10000	LI-COR

Tabla 7. Anticuerpos empleados en este trabajo. En la tabla se describen los anticuerpos que se han utilizado durante la realización del presente trabajo detallando la dilución en la que se ha utilizado cada uno de ellos.

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

Para posibilitar la hibridación de una membrana con más de un anticuerpo, dichas membranas (conservadas -20°C) se sumergieron en el tampón de *Stripping* (100 mM β -

mercaptoetanol, 2% SDS y 62.5 mM Tris-HCl pH 6.7) a 50°C durante 30 minutos en agitación. Posteriormente se realizaron 3 lavados de 10 minutos cada uno con TBS 1X-Tween 20 a temperatura ambiente.

Hubieron ciertas modificaciones en el método *Western blot* para los experimentos realizados con los anticuerpos fosfoespecíficos de Sch9 y Ypk1 del laboratorio de Robbie Loewith. Consultar apartado 8.1.

8. Análisis de fosforilación de Npr1, Sch9 y Ypk1

8.1. Ensayo de fosforilación de las quinasas Sch9 y Ypk1 por empleo de anticuerpos fosfoespecíficos

Para la inmunodetección de las fosfoproteínas Sch9 y Ypk1 se emplearon anticuerpos fosfoespecíficos. El anticuerpo α -Schp9_{PS758} reconoce la forma fosforilada de la Serina 758 de la proteína Sch9 y el anticuerpo Ypk1_{PT662} reconoce la forma fosforilada de la Treonina 662 de la proteína Ypk1.

En primer lugar las células se cultivaron en medio *Translucent* con KCl 50 mM. Una vez las células alcanzaron la fase exponencial, tras ser filtradas, se realizaron los respectivos tratamientos (ver apartado tratamientos celulares en medio líquido). Tras finalizar los tratamientos, se añadieron a 10 ml de cultivo (DO_{660} 0.5 - 0.6) 0.6 ml de ácido tricloroacético (TCA) al 100% (p/v). Esta mezcla de células y TCA se incubó en hielo durante al menos 5 minutos. Se recogieron las células por centrifugación (5 minutos, 1500 g, 4°C) y se transfirieron a un nuevo microtubo de rosca. Tras una nueva centrifugación (2 minutos, 13000 rpm, 4°C), se hicieron dos lavados con 0.5 ml de acetona fría (2 minutos, 13000 rpm, 4°C). Las muestras se secaron durante 5 minutos en una centrifuga *Speed vac*. Una vez secas se añadieron 100 μ l de tampón Urea (25 mM Tris pH6.8, 6 M Urea, 1% SDS) y se rompieron las células por agitación en presencia de aproximadamente 200 μ l bolas de vidrio de 0.5 mm de diámetro tras 5 ciclos de 45 segundos en el Mini *Bead beater* (Biospec Products), a 4°C. Se calentaron las muestras en un termobloque a 65°C durante 5 minutos y se centrifugaron (5 minutos, 13000 rpm). Se añadieron 100 μ l de tampón de carga Laemmli 2X que se mezcló por agitación breve con un Vortex. Las muestras fueron finalmente centrifugadas (5 minutos a 13000 rpm) para cargar las proteínas en un gel de un porcentaje del 7.5% de SDS y 0.75 mm de grosor. La electroforesis se realizó a 80 V durante 30 minutos y las 2 horas siguientes a 120 V, hasta que la proteína marcadora de 100 kDa alcanzó el final del gel. Una vez separadas las proteínas por electroforesis, se transfirieron a membranas de nitrocelulosa. Para la transferencia a membrana de nitrocelulosa, se utilizó el set *iBlot® Dry Blotting System* (Life Technologies). Se

seleccionó el programa 3 para proteínas de interés de un tamaño superior a 150 kDa. La solución de bloqueo así como la solución con los anticuerpos se realizó con BSA (*Bovine Serum Albumin*) al 5% (0.1% Tween 20, 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄ y 5% BSA). Los lavados del exceso de anticuerpo se realizaron con PBS-Tween 20 (0,1% Tween 20, 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄). La dilución de los anticuerpos primarios (α -Sch9_{PS758} y α -Ypk1_{PT662}) y secundarios se indica en la tabla 7. Como control de carga se emplearon los anticuerpos α -Sch9_{TOTAL} y α -Ypk1_{TOTAL} que reconocen la proteína Sch9 y Ypk1, respectivamente, independientemente de las modificaciones post-traduccionales. La fluorescencia fue analizada empleando el sistema de imágenes por infrarrojos *Odyssey* (LI-COR). El sistema de imágenes por infrarrojos *Odyssey* (LI-COR) permite la detección de infrarrojos de dos canales distintos con la misma sensibilidad y un amplio rango dinámico. La señal detectada se cuantificó mediante el *software* Image Studio Lite de LI-COR v 4.0.

8.2. Ensayo de fosforilación de la quinasa Npr1 por alteración en la movilidad electroforética

Para la detección del cambio en la fosforilación de Npr1 por alteración en su movilidad electroforética en condiciones de potasio limitante se recogieron 4.5 ml del cultivo celular a una DO₆₆₀ de 0.5 por centrifugación a 1500 *g* durante 5 minutos. Las células se resuspendieron en 50 μ l de tampón de carga Laemmli 2.5X y se incubaron a 95 °C durante 5 minutos. La electroforesis se realizó a 50 V durante 1 hora y 30 minutos y las horas siguientes a 120 V, hasta que la proteína marcador de 100 kDa alcanzó el final del gel. Las proteínas fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa y analizadas con el anticuerpo anti-HA (Covance) a una dilución 1:5000. El anticuerpo secundario α -HRP-*Mouse* fue detectado por el kit de detección *ECL Plus* (Amersham). La señal detectada también se cuantificó mediante el *software* Image Studio Lite de LI-COR.

El protocolo de extracción con TCA descrito en el apartado anterior (Apartado 8.1) se realizó también para la detección del cambio en la fosforilación de Npr1 por alteración en su movilidad electroforética en condiciones de ayuno de potasio. Estos experimentos se realizaron en medio *Translucent* tal y como se indica en el apartado tratamientos celulares en medio líquido. La electroforesis y la inmunodetección de proteínas se realizó como se describe en el párrafo anterior.

9. Estudio de la localización celular de proteínas por microscopía confocal

Las imágenes de fluorescencia se obtuvieron sobre células vivas crecidas hasta fase exponencial empleando un microscopio confocal Zeiss 780 con un objetivo plan acromático 40X aceite/1.3 de apertura numérica. Las muestras se excitaron a 488 nm y la emisión de GFP se recogió en un rango de entre 510 y 550 nm (*software ZEN 2012*).

10. Otras medidas fisiológicas en células de levadura

10.1. Medida del consumo de glucosa

Las cepas indicadas se crecieron en YPD a pH 4.5 hasta fase logarítmica. Posteriormente se diluyeron en medio fresco a una densidad óptica (DO_{660}) de 0.2. Se recogieron muestras por centrifugación en los tiempos indicados. Se determinó el número de células así como la concentración de glucosa del medio empleando protocolos estándar que emplean un conjunto de reacciones acopladas de glucosa oxidasa (Roche) y peroxidasa (Roche) con la sal de diamonio de 2,2-azino-bis (ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico, Merck) como cromóforo, a 420 nm. Los datos obtenidos se representaron como concentración de glucosa ($\mu\text{M}/\text{células}/\text{ml}$).

10.2. Medida de la producción de etanol

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

10.3. Medida de la toma de metionina

Para las medidas de toma de metionina, las cepas indicadas se crecieron hasta fase logarítmica y se recogieron 50 ml de cultivo por centrifugación (1500 *g* durante 5 minutos). Las células se lavaron con agua *Milli-Q* estéril, se resuspendieron en 5 ml de medio SuGlu (50 mM ácido succínico pH 5.5, 2% glucosa) y se incubaron durante 20 minutos a 28°C. Se determinó el número de células de cada muestra utilizando un contador de partículas (*Particle Count and Size Analyzer Z2*, Coulter Inc.). Las medidas de toma de metionina se realizaron añadiendo a las células metionina marcada con ^{14}C

(American Radiolabelled Chemicals, St. Louis, Mo.) hasta una concentración final de 10 μM . Se recogieron muestras en los tiempos indicados, se separaron las células por filtración y se dejaron secar los filtros durante toda la noche. Al día siguiente se añadió un volumen de 3 ml de cóctel de centelleo a cada filtro y se midió la radiactividad utilizando un contador de centelleo (Pharmacia Wallac 1410). Los datos se indicaron en μmol de metionina por mg de células.

10.4. Medida de la concentración intracelular de K^+

Las cepas indicadas fueron cultivadas en YPD hasta fase logarítmica y tratadas durante 60 minutos con 200 ng/ml de rapamicina o su vehículo. Posteriormente se recogieron 5 ml de cada muestra (DO_{660} 0.6 - 0.8) por centrifugación a 1500 g durante 5 minutos a 4°C. Las células se lavaron dos veces con 10 ml de solución de lavado fría (20 mM MgCl_2 , 180 mM sorbitol) y una vez con 1 ml de solución de lavado fría por resuspensión y subsecuente centrifugación. El precipitado se resuspendió en 0.5 ml de MgCl_2 20 mM. Los iones se extrajeron por calor a 95°C durante 15 minutos. Tras centrifugar los extractos durante 10 minutos a máxima velocidad se tomaron alícuotas con el sobrenadante que fueron analizadas con un espectrómetro de absorción atómica (Varian) en el modo de emisión de llama.

11. Tratamiento estadístico de datos

El análisis estadístico utilizado para comparar dos tipos de muestras se llevó a cabo mediante una prueba *t de Student* para diferencia de medias de muestras independientes utilizando las herramientas estadísticas incluidas en el programa MS Excel de la *suite* Microsoft Office. Un valor $p < 0.05$ fue considerado estadísticamente significativo.

Capítulo 1

**PAPEL DE LAS QUINASAS HAL4 Y HAL5 EN
LA TOMA DE NUTRIENTES**

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

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

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

En todas las cepas probadas (32 mutantes diferentes), salvo en el mutante *trk1* donde sí se observa una pérdida de la tolerancia a la sal tóxica LiCl al sobreexpresar tanto *HAL4* como *HAL5*, los resultados fueron negativos (Perez-Valle et al., 2010).

2. Análisis transcriptómico del mutante *hal4 hal5*

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

Para la caracterización del mutante *hal4 hal5* en base a su transcriptoma se compararon los perfiles transcripcionales de la cepa silvestre (WT) y de la cepa mutante *hal4 hal5* en dos fondos genéticos: W303-1A y BY4741, empleando *microarrays* de DNA. Estos experimentos fueron realizados por el grupo como paso previo al comienzo de este trabajo, y se presentan aquí ya que representan la base del proyecto presentado.

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

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

En el fondo genético W303-1A se seleccionaron 709 genes de los cuales 457 presentaban niveles de expresión más altos en el mutante *hal4 hal5* que en la cepa silvestre y 252 genes presentaban menores niveles de expresión en la cepa *hal4 hal5* que en la cepa silvestre. El grupo de genes diferencialmente expresados en el fondo genético BY4741 fue de 260. En este caso, se seleccionaron 194 genes con mayores niveles de expresión en el mutante *hal4 hal5* que en la cepa silvestre y 66 genes que presentaron un nivel de expresión menor en el mutante *hal4 hal5* que en la cepa silvestre.

A pesar de la diferencia entre el número de genes diferencialmente expresados en el mutante *hal4 hal5*, que es considerablemente mayor en el fondo genético W303-1A, la correlación entre genes inducidos y reprimidos es muy alta en ambos fondos genéticos. Aproximadamente un 70% (139 de 194) de los genes que están inducidos en el mutante *hal4 hal5* del fondo genético BY4741 también lo están en este mutante *hal4 hal5* en el fondo genético W303-1A. Lo mismo sucede con los genes que aparecen como reprimidos. Cerca del 60% (40 de 66) de dichos genes en el mutante *hal4 hal5* aparecen como reprimidos tanto en el fondo genético BY4741 como en el fondo genético W303-1A.

En la tabla 8 se muestran las categorías funcionales que se encuentran sobrerrepresentadas en la lista de genes tanto inducidos como reprimidos.

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

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

Tabla 8. Categorías funcionales de los genes regulados diferencialmente en el mutante *hal4 hal5*. Las categorías funcionales fueron identificadas empleando la herramienta *GO Term Finder* de la base de datos *Saccharomyces Genome Database* (<http://www.yeastgenome.org/>). Se consideraron significantes las categorías con un valor $p < 0.01$. Las subcategorías relevantes se indican en cursiva (Perez-Valle et al., 2010).

Tanto en el fondo genético BY4741 como en el W303-1A aparecen significativamente sobrerrepresentadas en la lista de genes **inducidos** del mutante *hal4 hal5* varias categorías funcionales relacionadas con el metabolismo energético y con la asimilación de sulfato. Además, en el fondo genético W303-1A, cuya lista de genes inducidos era superior, aparecen nuevas categorías que se relacionan con el metabolismo de carbohidratos y la respuesta a estrés.

Entre los genes que aparecen en el mutante *hal4 hal5* como **reprimidos**, en el fondo BY4741 aparecen sobrerrepresentadas significativamente categorías funcionales relacionadas con el metabolismo de nucleótidos y concretamente con la biosíntesis de adenina, así como categorías relacionadas con el metabolismo de aminoácidos. También aparece sobrerrepresentada de forma significativa, en menor medida, la categoría funcional de asimilación de hierro. En el fondo genético W303-1A, entre los genes reprimidos en el mutante *hal4 hal5*, también se observa una sobrerrepresentación de estas categorías funcionales con la excepción de la categoría de asimilación de hierro, que no aparece representada. Por otra parte, en este fondo genético, entre los genes reprimidos en el mutante *hal4 hal5* también aparecen sobrerrepresentados algunos genes relacionados con las categorías funcionales de biogénesis de ribosomas y biosíntesis de ergosterol.

La realización de los experimentos en estos dos fondos genéticos que poseen distintos genotipos en cuanto a la dependencia de adenina y metionina, tuvo como objetivo descartar que los efectos observados fueran debidos a las auxotrofías propias de la cepa mutante. El fondo genético W303-1A es *ade2 MET15* y el fondo genético BY4741 es *ADE2 met15*. Se puede observar que la identificación de los genes diferencialmente expresados relacionados con la biosíntesis de metionina y adenina no es debida al fondo genético puesto que los resultados son prácticamente idénticos y por tanto independientes de estos.

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

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

3. Metabolismo respiratorio en el mutante *hal4 hal5*

En el análisis transcriptómico descrito se ha observado una inducción de genes relacionados con el metabolismo energético, así por ejemplo, genes relacionados con la cadena respiratoria se acumulan en mayores niveles en el mutante *hal4 hal5*.

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

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

Para comprobar esta hipótesis, se procedió a medir el consumo de glucosa en la cepa WT y en la cepa mutante *hal4 hal5* mediante protocolos estándar que emplean un conjunto de reacciones acopladas de glucosa oxidasa (Roche) y peroxidasa (Roche), tal y como viene indicado en Materiales y Métodos. Como puede observarse en la figura 20, el mutante *hal4 hal5* consume glucosa en menor proporción y a una tasa menor que la cepa WT.

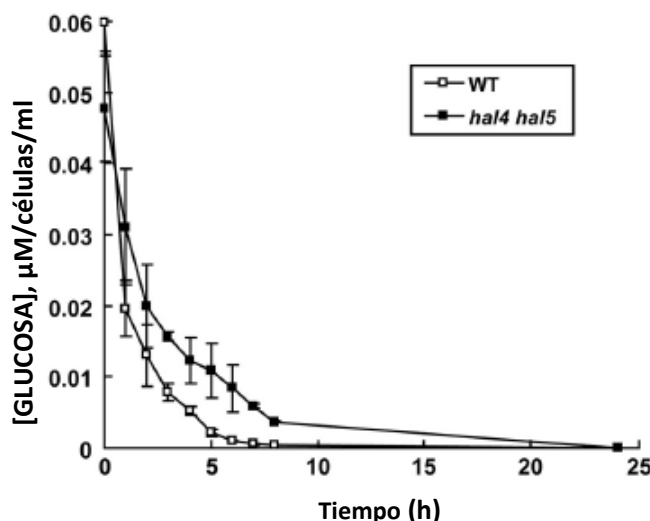


Figura 20. Cambios en el metabolismo respiratorio en el mutante *hal4 hal5*: consumo de glucosa. Las cepas indicadas del fondo genético W303-1A fueron cultivadas hasta fase exponencial en medio YPD pH 4.5. Se midió su DO_{660} , se ajustaron a 0.2 en medio fresco y se tomaron muestras en diferentes tiempos determinándose la cantidad de glucosa en el medio (WT: □; *hal4 hal5*: ■). Los gráficos muestran los valores medios y la desviación estándar de tres experimentos independientes con tres réplicas de cada muestra.

Si las células *hal4 hal5* consumen menos glucosa debido a un defecto en la toma de la misma, se espera que la producción de etanol también sea menor en comparación con las células silvestres. Para confirmar esta hipótesis se midió también la producción de etanol en la cepa silvestre y en el mutante *hal4 hal5*. Los datos presentados en la figura 21 confirman esta hipótesis.

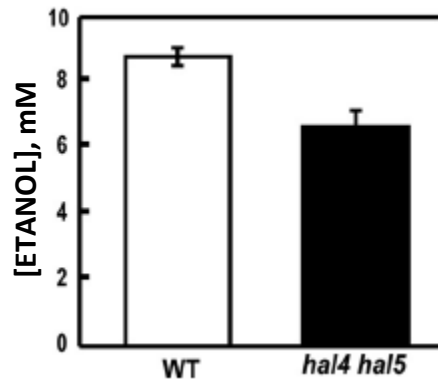


Figura 21. Cambios en el metabolismo respiratorio en el mutante *hal4 hal5*: producción de etanol. Las cepas indicadas (W303-1A) fueron cultivadas hasta fase exponencial en medio YPD pH 4.5. Se midió su DO_{660} , se ajustaron a 0.2 en medio fresco y se tomaron muestras en diferentes tiempos determinándose la producción de etanol. Los gráficos muestran los valores medios y la desviación estándar de tres experimentos independientes con tres réplicas de cada muestra.

La reducción observada en el flujo glicolítico podría explicar la inducción del metabolismo respiratorio en el mutante *hal4 hal5* con el objetivo de optimizar la producción de energía por las células. Otra prueba de ello es la mayor actividad succinato deshidrogenasa (SDH) observada en el mutante *hal4 hal5* (Perez-Valle et al., 2010), un indicador de la funcionalidad de las mitocondrias y por consiguiente de esta mayor inducción de genes relacionados con el metabolismo energético que se ha observado en el análisis transcriptómico del mutante *hal4 hal5*.

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

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

Prácticamente todos los genes implicados en la biosíntesis de metionina aparecen inducidos en el mutante *hal4 hal5* (Perez-Valle et al., 2010). Por ello, se planteó la hipótesis de que dicha inducción pudiera ser consecuencia de un defecto en la toma de dicho aminoácido. Para comprobar esta hipótesis se realizaron ensayos de toma de metionina en la cepa silvestre y en el mutante *hal4 hal5*. El mutante *hal4 hal5* presenta menores niveles de toma máxima de metionina que la cepa silvestre después de 10

minutos de ensayo (en torno a un 50% menor), así como una menor velocidad inicial de toma (Figura 22).

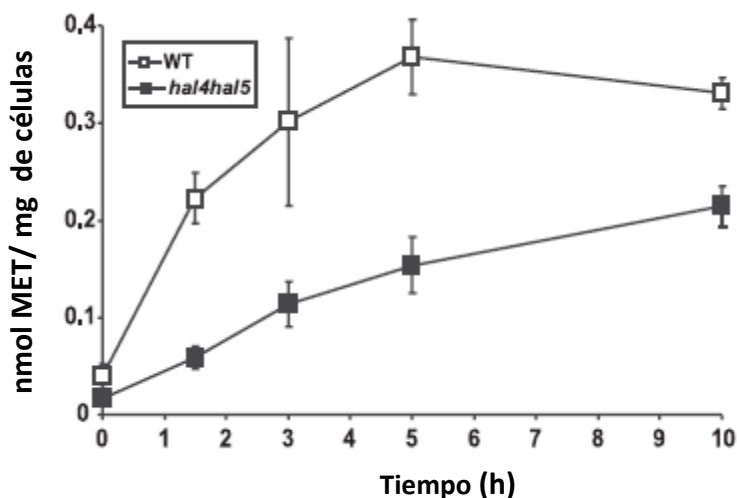


Figura 22. Toma de metionina en la cepa silvestre y en el mutante *hal4 hal5*. Las cepas indicadas (fondo genético W303-1A) se crecieron hasta fase logarítmica, se recogieron las células y se utilizaron en ensayos de toma de metionina. Los ensayos se realizaron en medio YPD pH 4.5 (WT: □; *hal4 hal5*: ■). Los datos se muestran en nmoles de metionina por mg de células, y son la media de tres experimentos independientes.

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

4.1. Estabilidad de la permeasa Mup1 en el mutante *hal4 hal5* en condiciones limitantes de KCl

El defecto en la toma de metionina observado en el mutante *hal4 hal5* podría implicar una deslocalización en la membrana plasmática de algún transportador específico de metionina, como la permeasa de alta afinidad de metionina Mup1 (Gits and Grenson, 1967). Para abordar esta hipótesis se analizó por microscopía confocal la localización subcelular de la proteína de fusión Mup1-GFP en células WT y en células del mutante *hal4 hal5* (Figura 23).

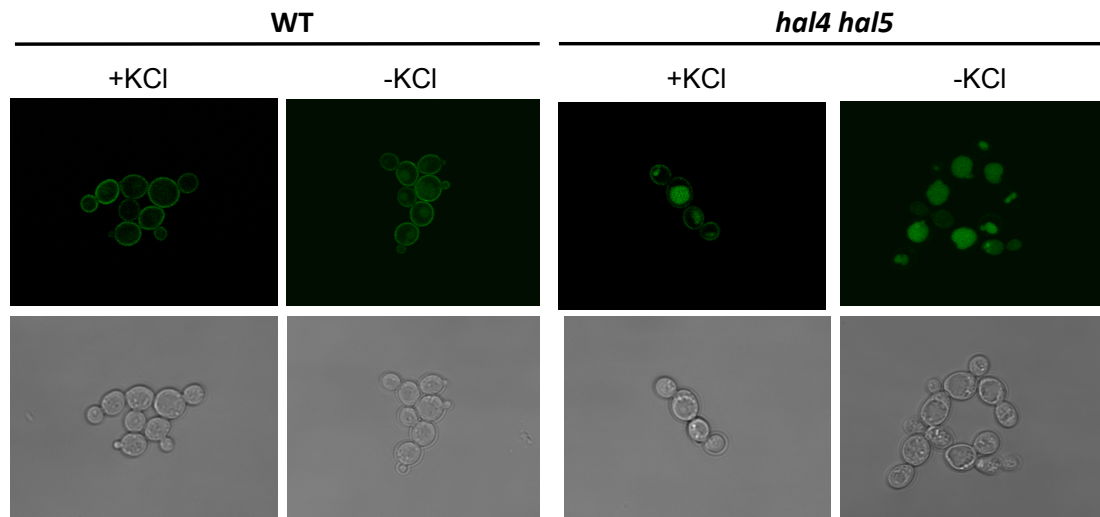


Figura 23. Localización subcelular de la permeasa de metionina Mup1-GFP en la cepa silvestre y en el mutante *hal4 hal5* en condiciones de potasio limitante. Las cepas indicadas del fondo genético W303-1A fueron transformadas con un plásmido que expresa la proteína de fusión Mup1-GFP, pRS416-MUP1-GFP, crecidas hasta fase logarítmica en medio mínimo suplementado con KCl 0.1 M y posteriormente lavadas y transferidas a medio mínimo sin suplemento de potasio durante 120 minutos. Estas células se analizaron por microscopía confocal. Se muestran las imágenes más representativas de cada situación. Este experimento se repitió en tres clones independientes.

Tanto en presencia como en ausencia de suplemento de potasio, la permeasa Mup1 en la cepa silvestre posee una correcta localización en la membrana plasmática. Sin embargo, en el caso del mutante *hal4 hal5*, en un medio suplementado con potasio la cantidad de Mup1-GFP observada en la membrana plasmática es mucho menor que la observada en la cepa WT, y tanto la presencia como la ausencia de potasio en el medio da lugar a una gran acumulación de GFP vacuolar. Estos resultados concuerdan con los datos publicados por Pérez-Valle y colaboradores donde se obtuvieron evidencias de que las proteínas quinasas Hal4 y Hal5 están involucradas en la modulación del tráfico de un conjunto de transportadores de la membrana plasmática (Perez-Valle et al., 2007).

Estos resultados fueron confirmados por análisis *Western blot* de los extractos proteicos fraccionados empleando un anticuerpo específico que reconoce el GFP (Figura 24). En ausencia de los genes *HAL4* y *HAL5* hay una reducción de la señal de Mup1-GFP en la fracción insoluble correspondiente a la membrana plasmática, mientras que se observa una mayor acumulación de GFP en la fracción soluble, la cual contiene el lumen vacuolar.

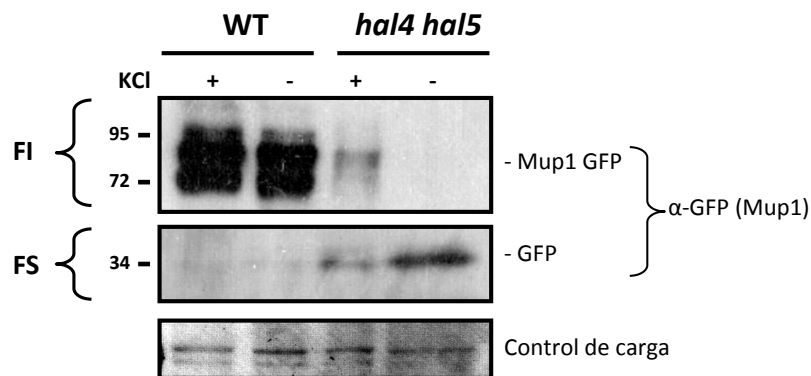


Figura 24. Análisis Western blot de la proteína Mup1 en la cepa silvestre y en el mutante *hal4 hal5* en condiciones de potasio limitante. Las proteínas de la fracción soluble (FS) e insoluble (FI) se aislaron de las cepas indicadas expresando un plásmido con la proteína de fusión Mup1-GFP, tratadas como se ha descrito en la figura 23. El anticuerpo anti-GFP reconoce la proteína de fusión Mup1-GFP. Se muestra la tinción con *Ponceau S* (*PonS*) como control de carga de proteínas. Los marcadores de peso molecular se muestran a la izquierda de la figura (kDa).

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

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

El descenso en los niveles de toma de algunos aminoácidos como la metionina o la leucina en la cepa mutante *hal4 hal5* podría producir en estas células un ayuno de aminoácidos. Ello daría lugar a un cambio en los niveles de actividad de la ruta GCN, ruta de respuesta al ayuno de aminoácidos. En concreto, el activador Gcn4 está regulado por un complejo mecanismo de control traduccional que hace que células que están sufriendo un ayuno de aminoácidos presenten niveles de Gcn4 aumentados, lo que a su vez produce un aumento en la transcripción de los genes de biosíntesis de aminoácidos que se encuentran bajo su control. Este fenómeno es esencial para mantener el crecimiento celular en condiciones de ayuno de aminoácidos (Hinnebusch, 2005).

Es por ello que se midieron los niveles de actividad de esta ruta GCN mediante un análisis de la actividad β -galactosidasa en cepas WT y *hal4 hal5* transformadas con un

plásmido que contiene una fusión del promotor del gen *GCN4* y el gen *lacZ*, comprobándose que la cepa mutante *hal4 hal5* presenta de forma constitutiva una mayor actividad de la ruta GCN que la cepa silvestre, lo que refuerza la hipótesis del ayuno de aminoácidos que está sufriendo esta cepa (Perez-Valle et al., 2010).

4.2 Acumulación de la permeasa Mup1 en el mutante *hal4 hal5* en condiciones de ayuno de metionina

El objetivo siguiente consistió en estudiar si la síntesis y transporte de Mup1 a la membrana plasmática se encuentra también alterada en el mutante *hal4 hal5*. Previamente hemos observado (Figuras 23 y 24) que en condiciones limitantes de potasio en el medio esta permeasa se degrada en la vacuola. Este proceso requeriría probablemente la endocitosis de Mup1 como primer paso. Sin embargo, en condiciones de suplemento de potasio, también se observa que la estabilidad del transportador de metionina de la membrana plasmática Mup1 se ve afectada en el mutante *hal4 hal5*.

Para abordar esta hipótesis, en primer lugar, se indujo mediante la adición de metionina al medio la degradación vacuolar de la proteína de fusión Mup1-GFP en la cepa WT y en el mutante *hal4 hal5*. La presencia de altas concentraciones de metionina en el medio produce la remodelación celular en cuanto a su capacidad de transporte de metionina de forma que el transportador de metionina Mup1 es degradado en la vacuola (Menant et al., 2006; Teis et al., 2008). Posteriormente se lavaron las células con el fin de eliminar la metionina del medio e inducir la biosíntesis de Mup1 y su llegada a la membrana plasmática. Estas mismas células se cultivaron paralelamente en presencia de un suplemento de KCl 0.1 M y en ausencia de dicho suplemento (Figura 25).

Ante un ayuno de metionina y en presencia de KCl 0.1 M en el medio, el mutante *hal4 hal5* sí presenta un defecto en llegada de Mup1 a la membrana plasmática, a diferencia con la cepa silvestre. La cepa *hal4 hal5* presenta un menor contenido de Mup1 en la membrana plasmática y un alto contenido en la vacuola. Cuando se elimina del medio el suplemento de potasio, como ya habíamos observado previamente, la localización de Mup1 es estrictamente vacuolar indicando que el defecto podría ser mayor en estas condiciones.

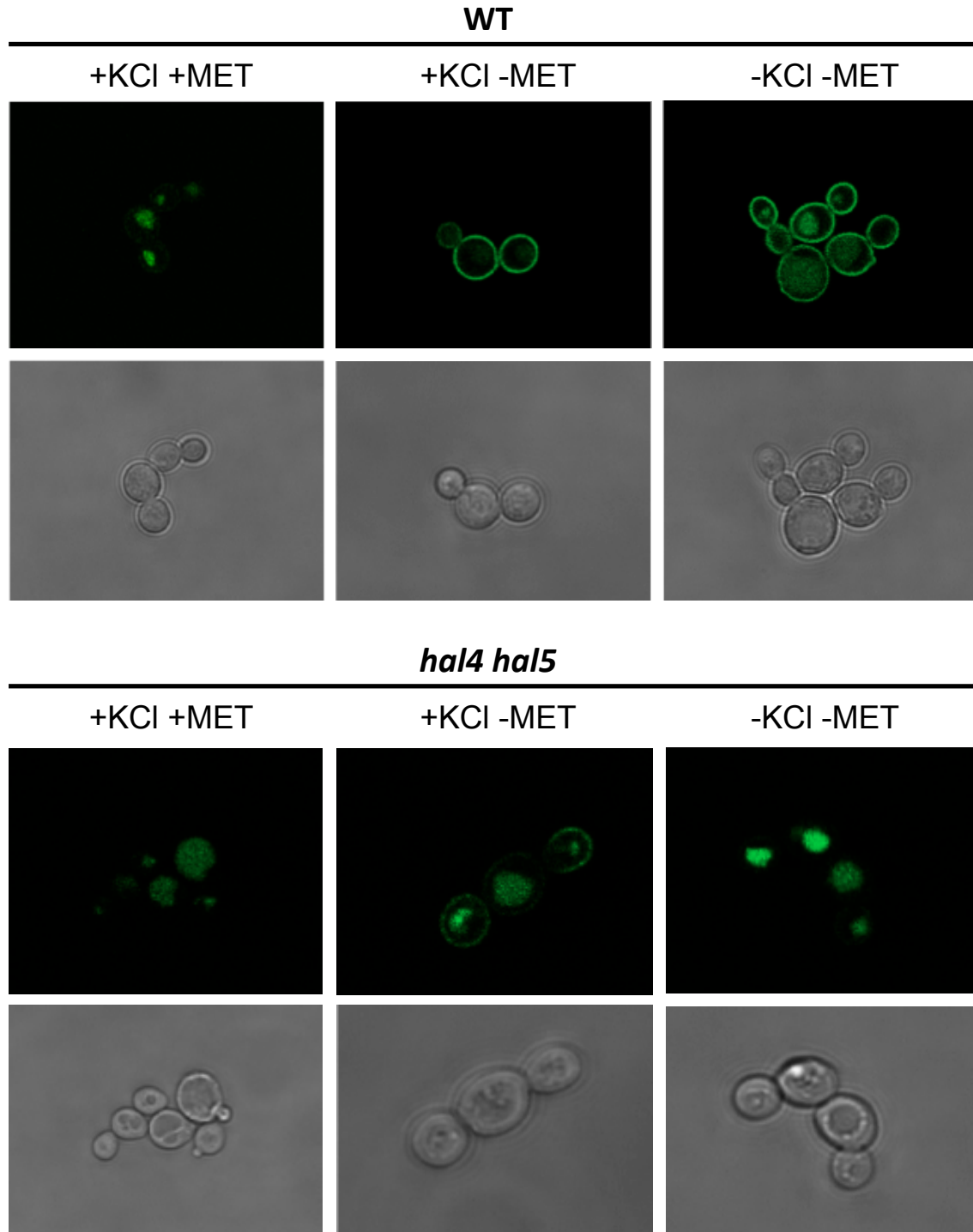


Figura 25. Localización subcelular de la permeasa Mup1-GFP en la cepa silvestre y en el mutante *hal4 hal5* en condiciones de ayuno de metionina. Imágenes obtenidas por microscopía confocal de la localización de la proteína de fusión Mup1-GFP en la cepa silvestre y en el mutante *hal4 hal5* en el fondo genético W303-1A. Las cepas transformadas con el plásmido pRS416-*MUP1-GFP* fueron cultivadas en un medio mínimo suplementado con una concentración de metionina 20 µg/ml y KCl 0.1 M hasta fase logarítmica. Posteriormente, tras ser eliminada la metionina del medio, las células se cultivaron paralelamente en presencia y ausencia de KCl 0.1 M durante 120 minutos. Se muestran las imágenes más representativas de cada situación. Este experimento se realizó en tres clones independientes.

Estos resultados se confirmaron por análisis *Western blot* empleando un anticuerpo Anti-GFP (Figura 26). Se analizaron los extractos proteicos correspondientes a la fracción insoluble. Pudimos comprobar que el contenido de Mup1 en la membrana plasmática, ante un ayuno de metionina, es mucho menor en el mutante *hal4 hal5* en comparación con la cepa WT.

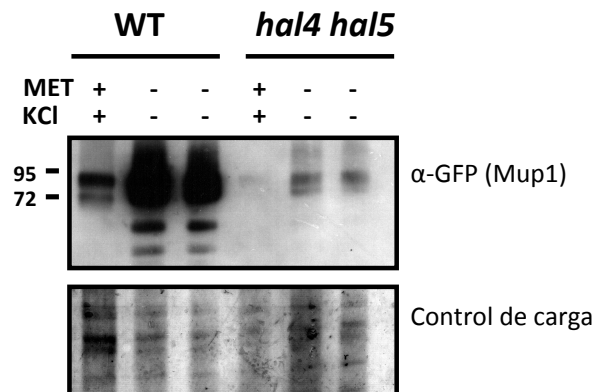


Figura 26. Análisis *Western blot* de la proteína Mup1 en la cepa silvestre y en el mutante *hal4 hal5* en condiciones de ayuno de metionina. Las proteínas procedentes de la fracción insoluble se aislaron de las cepas indicadas expresando un plásmido con la fusión Mup1-GFP, tratadas como se ha descrito en la figura 25. El anticuerpo anti-GFP reconoce la fusión Mup1-GFP. Se muestra la tinción con *Direct Blue* como control de carga de proteínas. Los marcadores de peso molecular se muestran a la izquierda de la figura (kDa).

Estos datos concuerdan con los resultados obtenidos hasta el momento sobre el defecto que esta cepa carente de los genes *HAL4* y *HAL5* presenta en la toma de metionina, sugiriendo un papel adicional de estas quinasas.

4.3. Regulación de Mup1 por la familia ARTs: ensayos de doble híbrido

La familia de proteínas ARTs, como ya ha sido descrita en la introducción, es una familia cuya función es regular la endocitosis de proteínas específicas de la membrana plasmática a través del reclutamiento y direccionamiento de la ubiquitina ligasa Rsp5 hacia sus dianas (Lin et al., 2008). Evidencias genéticas y moleculares indican que existe interacción entre la permeasa Mup1 y Art1. También se ha descrito que tras ciertos estreses ambientales Art1 y Art2 parecen reconocer respectivamente los elementos de la cola citosólica N-terminal de las permeasas de aminoácidos Can1 y Lyp1 (Lin et al., 2008; Nikko and Pelham, 2009).

En este apartado postulamos la hipótesis de que la región de la interacción entre el transportador Mup1 y Art1 u otros miembros de la familia como Art2, Art3 y Art4, se encontrara también en la cola citosólica del extremo N-terminal de este transportador.

En algunos casos se ha observado redundancia de función entre Art1 y Art2 en determinados *cargos* (Nikko and Pelham, 2009). Para probar dicha hipótesis se clonaron las 180 pares de bases del extremo N-terminal de Mup1 y se realizaron ensayos de doble híbrido con los miembros de la familia ARTs Art1, Art2, Art3 y Art4. Mediante el clonaje de sólo el fragmento citosólico N-terminal de la permeasa Mup1, y no de la permeasa completa, tratamos de evitar también las limitaciones del estudio de interacciones proteína-proteína por doble híbrido que excluye a las proteínas transmembranales por su incapacidad de translocarse al núcleo para reconstituir el factor de transcripción en el promotor del gen reportero.

El ensayo de doble híbrido se realizó mediante la co-transformación de la cepa THY.AP4 de levadura con el plásmido pBTM116, donde se clonó el extremo citosólico de *MUP1* y con los plásmidos de sus posibles dianas *ART1*, *ART2*, *ART3* y *ART4*, que fueron clonados en el vector pACTII. Cada uno de estos vectores posee el dominio del factor de transcripción específico, como se describió en Materiales y Métodos. Para descartar el fenómeno de “transactivación” se utilizaron como control negativo células co-transformadas con el vector pACTII vacío y el plásmido correspondiente a la región citosólica de *MUP1* (pBTM116-*MUP1-NT*). Los ensayos de crecimiento en medio sólido se realizaron en diferentes condiciones de crecimiento tal como se indica en la figura 27. Sólo observamos crecimiento en el control positivo.

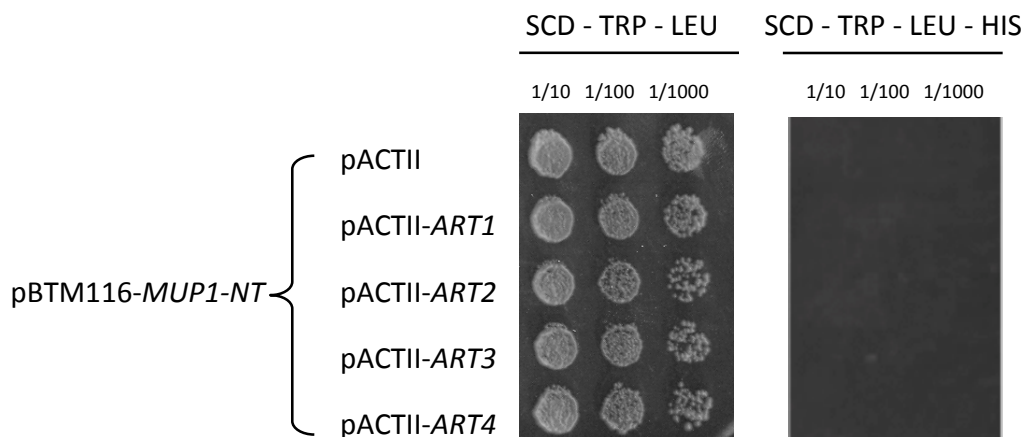


Figura 27. Ensayo de doble híbrido entre el extremo N-terminal de Mup1 y los miembros de la familia ARTs: Art1, Art2, Art3 y Art4. Las células se crecieron hasta saturación en medio mínimo SCD suplementado con histidina y uracilo. Se realizaron diluciones seriadas y se depositaron en placas sólidas de los medios indicados. Se tomaron imágenes del crecimiento después de 48-72 horas de incubación a 28 °C.

Las interpretaciones que se pueden dar a estos resultados son varias. Podría pensarse que no existe interacción física entre el extremo N-terminal de Mup1 y las proteínas Art1, Art2, Art3 y Art4, aunque en el caso de Art1 algunos autores han demostrado que sí existe interacción física entre Art1 y Mup1 (Lin et al., 2008). Esta conclusión se

ceñiría al caso de los adaptadores Art2, Art3 y Art4. Otra explicación plausible podría ser que no existe interacción o que los dominios de interacción entre los Arts y Mup1 no se encuentran en las 180 pb del extremo N-terminal de este transportador de la membrana. Esto explicaría la ausencia de interacción observada entre Mup1 y Art1. Una tercera posibilidad sería la existencia de un problema técnico que impide detectar interacciones positivas o bien que dicho extremo N-terminal no es suficiente para dar lugar a una proteína funcional. Es muy probable que al aislar el fragmento N-terminal del resto de la permeasa se pierda su contexto molecular y con ello la capacidad de interactuar con otras proteínas. Para comprobar esta última hipótesis se deberían utilizar otras técnicas que permitan analizar la interacción con la proteína entera en su contexto fisiológico.

4.4. Ensayos de interacción genética entre las proteínas Mup1, Art1 y Art2 del fondo genético BY4741

En este apartado establecimos ensayos genéticos para reproducir las observaciones de los experimentos realizados por Charles H. Lin y sus colaboradores, donde sí observan una interacción genética (y física) entre Mup1 y Art1, así como para identificar además otras proteínas implicadas en este proceso como el adaptador Art2, que presenta en ocasiones redundancia de función con Art1 (Lin et al., 2008; Nikko and Pelham, 2009).

En el presente trabajo se han empleado dos fondos genéticos: W303-1A y BY4741. Sin embargo, en todos los experimentos anteriores donde se ha trabajado con la permeasa de alta afinidad de metionina Mup1, se utilizó el fondo genético W303-1A ya que su ruta de biosíntesis de metionina permanece intacta. Sin embargo, el fondo genético de la colección de mutantes que queríamos emplear es el BY4741, auxótrofo para metionina, por lo que fue necesario fijar previamente las condiciones del experimento. La adición de metionina en el medio, imprescindible para el crecimiento de estas cepas, supone la internalización de Mup1. Ello nos obliga a estudiar la concentración de metionina que conduce a la degradación vacuolar de Mup1, así como los tiempos necesarios (sin metionina) para la acumulación de Mup1 en la membrana. Su desconocimiento puede llevarnos a conclusiones erróneas.

Con el fin de analizar estas variables, se cultivaron células WT que expresan la proteína de fusión Mup1-GFP y se observaron por microscopía confocal. El medio de cultivo empleado fue SCD, que presenta un contenido en metionina de 10 µg/ml. Se observó que dicha concentración es suficiente para originar la acumulación en la vacuola de Mup1 (datos no mostrados). Una vez las células se encontraban en fase logarítmica se procedió a realizar un ayuno de metionina (Figura 28). Un ayuno de metionina de tan solo 30 minutos es suficiente para que el transportador Mup1 se acumule en la

membrana, aunque ayunos más largos de metionina optimizan las cantidades de Mup1 en la membrana plasmática.

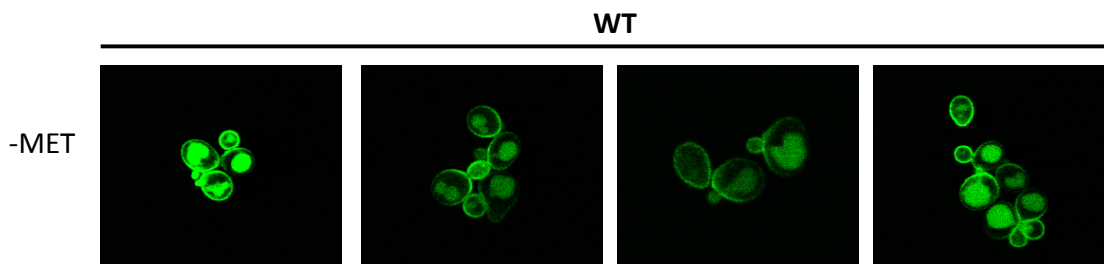


Figura 28. Condiciones de visualización en la membrana plasmática de la permeasa Mup1-GFP en el fondo genético BY4741. La cepa indicada fue crecida en un medio SCD suplementado con KCl 0.1 M hasta fase logarítmica. Posteriormente estas células fueron lavadas con agua estéril y transferidas a un medio SD suplementado con KCl 0.1 M y sin metionina. Las imágenes de microscopía confocal fueron tomadas tras 30 minutos del tratamiento de ayuno de metionina. Se muestran varias imágenes de esta situación.

Una vez fijadas las condiciones pudimos comenzar con los ensayos de localización subcelular de la proteína de fusión Mup1-GFP en nuestras cepas de estudio WT, *art1* y *art2*. Si Art1 es necesario en el proceso de internalización y degradación vacuolar de Mup1, en condiciones de exceso de metionina, en la cepa mutante *art1*, no tendría lugar la ubiquitinación de Mup1 ni su acumulación en la vacuola. En el caso de existir interacción genética entre Mup1 y Art2 observaríamos los mismos resultados en una cepa mutante *art2*.

Los resultados sólo fueron positivos en el caso del mutante *art1* (Figura 29), confirmándose la interacción descrita en la literatura (Lin et al., 2008; Nikko and Pelham, 2009). Mientras que la llegada de Mup1 a la membrana plasmática es correcta en las tres cepas de estudio, sólo en células *art1* se previene la internalización de Mup1 en condiciones de exceso de metionina. En células WT y células *art2* Mup1 se observa en la vacuola.

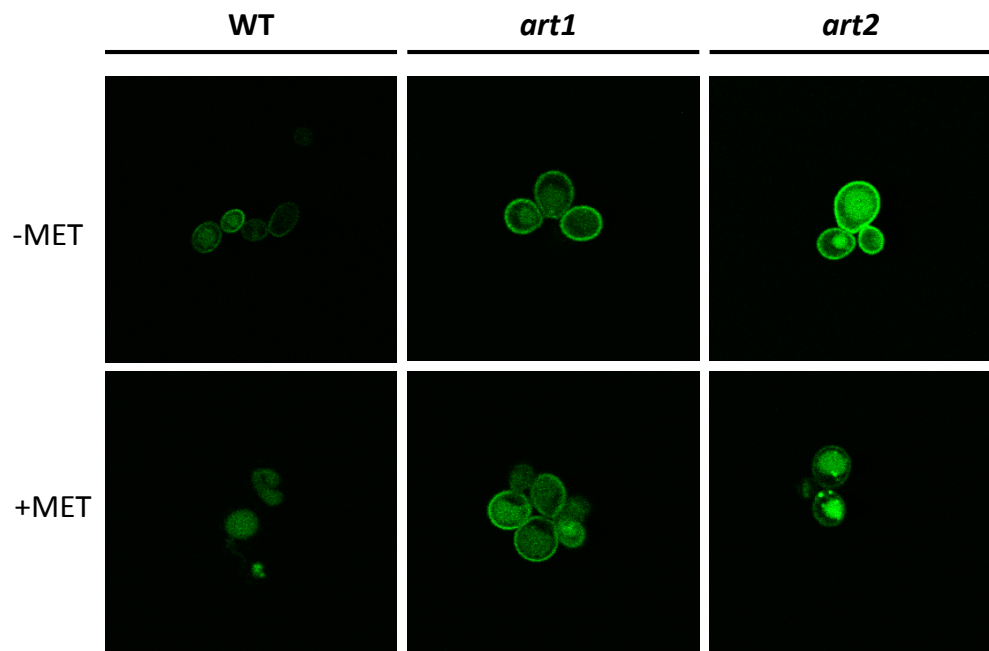
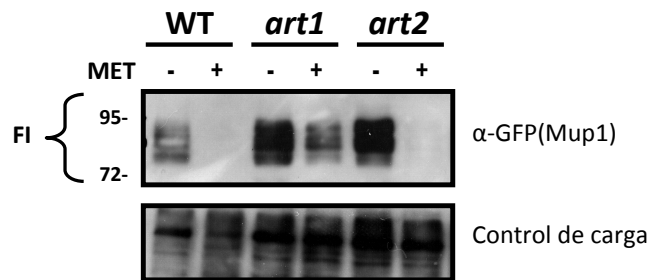


Figura 29. Acumulación en la membrana plasmática de la permeasa Mup1-GFP en las cepas silvestre, *art1* y *art2* del fondo genético BY4741 en medio sin y con metionina. Las cepas indicadas fueron crecidas en un medio con metionina y suplemento de KCl 0.1 M hasta fase logarítmica. Tras lavados con agua *Milli-Q* estéril, las células fueron transferidas a un medio sin metionina suplementado con KCl 0.1 M, durante 4 horas. Posteriormente se añadió al medio un suplemento de metionina de 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ durante 30 minutos. Ambas situaciones se analizaron por microscopía confocal. Se han mostrado las imágenes más representativas de cada situación. Resultados similares fueron observados en tres clones independientes.

Estos resultados fueron confirmados mediante análisis *Western blot* donde se analizaron las fracciones soluble e insoluble de los extractos proteicos. El análisis de la fracción insoluble en ausencia y presencia de metionina (Figura 30, panel A) indica que sólo en el caso del mutante *art1* se observa señal correspondiente a Mup1 tras la adición de metionina. No observamos señal de Mup1 en la fracción insoluble ni en la cepa WT ni en la cepa mutante *art2*. Respecto al contenido vacuolar que viene representado por la fracción soluble (Figura 30, panel B), en la cepa silvestre y en el mutante *art2* el contenido vacuolar de GFP aumenta considerablemente en medio con metionina, mientras que en la cepa mutante *art1* la variación de la señal de GFP (sin y con metionina) es mucho menor a la observada a la de los casos donde no hay interacción. Estos resultados indican que Mup1 está siendo dirigido a la vacuola gracias a la acción de Art1, que media la interacción entre Mup1 y Rsp5, mientras que Art2 no juega ningún papel en el proceso de endocitosis y posterior degradación vacuolar de este transportador en condiciones de exceso de metionina.

A



B

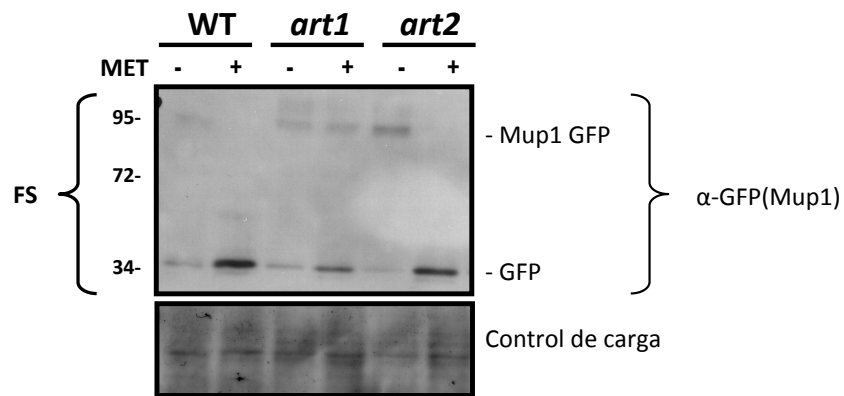


Figura 30. Análisis Western blot de la proteína Mup1 en la cepa silvestre y los mutantes *art1* y *art2* del fondo genético BY4741 en medio sin y con metionina. Las proteínas de la fracción insoluble (FI) (panel A) y de la fracción soluble (FS) (panel B) se aislaron en las cepas indicadas expresando un plásmido con la proteína de fusión Mup1-GFP y tratadas como se ha descrito en las figura 29. El anticuerpo anti-GFP reconoce la proteína de fusión Mup1-GFP. Se muestra la hibridación con anti-Pma1 (panel A) o la tinción con *Direct Blue* (panel B) como control de carga de proteínas. Los marcadores de peso molecular se muestran a la izquierda de la figura (kDa).

Podemos decir a la vista de los resultados que el producto del gen *ART1*, y no de *ART2*, es necesario para la internalización y posterior degradación vacuolar de su *cargo* Mup1 en presencia de un exceso de metionina.

Capítulo 2

**PAPEL DE LAS QUINASAS HAL4 Y HAL5 EN
EL TRAFICO DE TRANSPORTADORES DE LA
MEMBRANA PLASMATICA**

1. Implicación de las quinasas Hal4 y Hal5 en la endocitosis

Las proteínas de la membrana plasmática son sintetizadas e insertadas en la membrana del retículo endoplasmático. Posteriormente, tras viajar al aparato de Golgi, las vesículas exocíticas se fusionan con la membrana plasmática. Una vez allí, como se ha descrito en la Introducción, en respuesta a estímulos del entorno las proteínas de la membrana plasmática entran de nuevo en la célula por el proceso de endocitosis. Estas vesículas se pueden volver a fusionar con la membrana plasmática o seguir un proceso de maduración que culmina en la fusión de estas vesículas con la vacuola.

Los datos obtenidos hasta ahora indican que en los mutantes *hal4 hal5*, al menos algunos transportadores de la membrana plasmática como Can1, Hxt1, Gap1, Trk1, Fur4 y Mup1 (este trabajo) se acumulan en la vacuola (Perez-Valle et al., 2007). Estas observaciones se podrían explicar bien por la llegada directa de las proteínas recién sintetizadas a la vacuola o bien por un incremento en la endocitosis y posterior fusión de estas vesículas con dicha vacuola. Si específicamente esta degradación vacuolar de permeasas observada en condiciones de potasio limitante en una cepa *hal4 hal5* tiene lugar a través de la vía endocítica, la adición de Latrunculina A (LatA) bloqueará dicha degradación. La LatA es una droga cuya acción consiste en el secuestro del monómero de actina. Tras 5 minutos de su adición en el medio se inhibe completamente la endocitosis (Ayscough et al., 1997; Morton et al., 2000).

Para abordar esta hipótesis se analizó la localización subcelular de la proteína de fusión Mup1-GFP en la cepa *hal4 hal5* en condiciones limitantes de potasio (que inducen la acumulación vacuolar de Mup1), en presencia o no de LatA (Figura 31). En el panel A se observa como Mup1 se localiza en la membrana plasmática cuando hay suplemento de potasio en el medio. Sin embargo, 30 minutos en condiciones limitantes de potasio son suficientes para inducir la acumulación de Mup1 en la vacuola (panel B). En el panel C observamos como la LatA inhibe la acumulación vacuolar de Mup1.

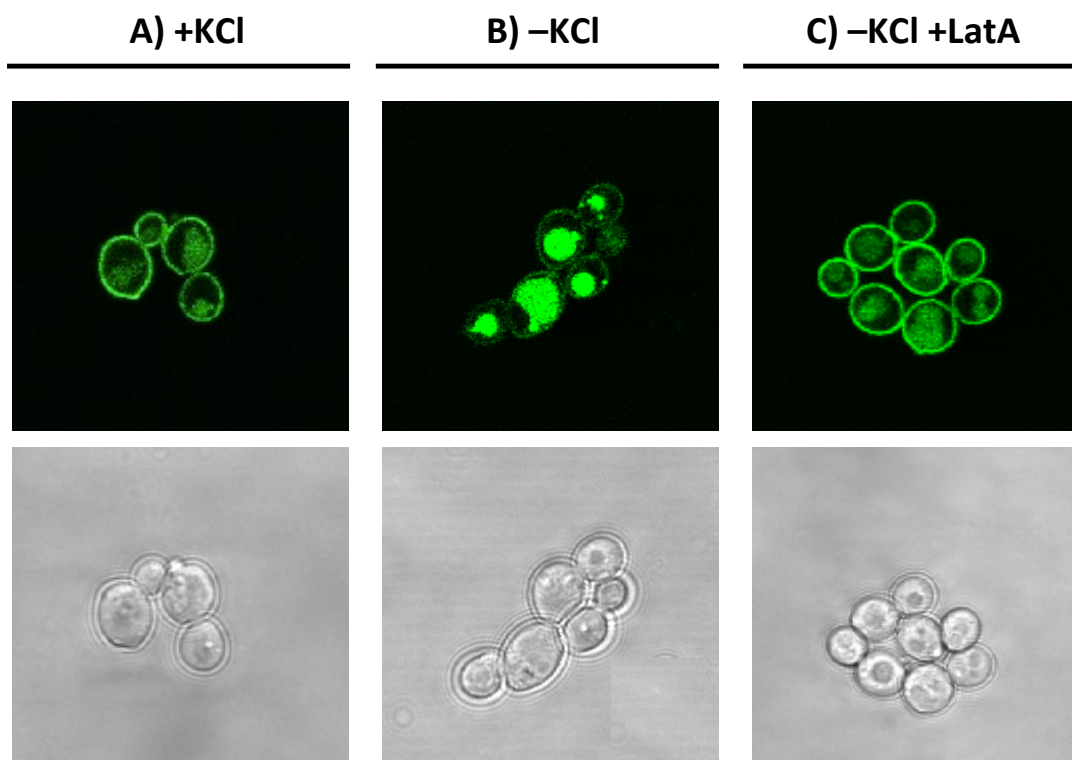


Figura 31. Efecto del inhibidor de la endocitosis Latrunculina A sobre la degradación vacuolar de Mup1 en un mutante *hal4 hal5*. Por microscopía confocal se analizó la localización subcelular de Mup1-GFP en un mutante *hal4 hal5* del fondo genético W303-1A crecido hasta fase exponencial, en tres condiciones diferentes. (A) En medio mínimo suplementado con KCl 0.1 M (+KCl). (B) Tras 30 minutos en medio mínimo sin suplemento de KCl (-KCl) y suplementado con el compuesto DMSO (el vehículo de la LatA). (C) Tras 30 minutos en medio mínimo sin suplemento de potasio y suplementado con LatA (-KCl + LatA). Se han mostrado las imágenes más representativas de cada situación. Este experimento se realizó en tres clones independientes.

Nuestros resultados demuestran que la acumulación vacuolar de Mup1 se previene con un tratamiento con LatA en un mutante *hal4 hal5* durante condiciones limitantes de potasio, indicando que la endocitosis es necesaria para la acumulación de Mup1 en la vacuola. Estos datos sugieren que las proteínas quinasas Hal4 y Hal5 son necesarias para la inhibición de la endocitosis y posterior degradación vacuolar de Mup1 en dichas condiciones.

2. Acumulación vacuolar dependiente de la ubiquitinación: implicación de las quinasas Hal4 y Hal5

Los resultados mostrados indican que en una cepa *hal4 hal5* los fenotipos de degradación vacuolar observados para las permeasas de la membrana plasmática (o al

menos Mup1) tienen lugar a través de la vía de endocitosis, lo que sugiere un posible papel para la ubiquitina ligasa Rsp5.

Se ha descrito en la Introducción un modelo propuesto recientemente de regulación dependiente de la fosforilación de Rsp5 (Sasaki and Takagi, 2013). La desfosforilación en la posición 357 origina un cambio conformacional en Rsp5 a su forma activa que reconoce y ubiquitina sus sustratos en el aparato de Golgi y en la membrana plasmática. Una variante de Rsp5 que no puede ser fosforilada en esta posición (Rsp5^{T357A}) confiere tolerancia al AZC, un análogo tóxico de la prolina. Esto tiene sentido puesto que esta variante es una isoforma hiperactiva de Rsp5 que produce la ubiquitinación de las permeasas que transportan prolina (y AZC) de manera constitutiva. Sin embargo, una versión mutada de Rsp5 que cambia la treonina 357 por un ácido aspártico (Rsp5^{T357D}) mimetiza el efecto de la fosforilación y es sensible a AZC. Ello sugiere que la forma fosforilada de Rsp5 representa un estado menos activo de Rsp5. Cabe destacar que la prolina y el AZC son importados eficientemente por las células por cuatro permeasas de aminoácidos (Gap1, Put4, Agp1 y Gnp1) (Andreasson et al., 2004).

Basándonos en el hecho de que la ubiquitinación mediada por Rsp5 desencadena la endocitosis y posterior degradación en la vacuola de muchas permeasas, en este trabajo, en primer lugar, quisimos comprobar este mecanismo por el cual la variante T357A de Rsp5 regula la actividad de las permeasas que transportan prolina. Para ello transformamos la cepa WT con los plásmidos centroméricos que portan la versión silvestre de Rsp5 o las versiones mutadas, Rsp5^{T357A} o Rsp5^{T357D}. Como ya había sido descrito por Sasaki y Takagi, las células transformadas con la versión más activa de Rsp5 (Rsp5^{T357A}) exhibieron una resistencia mayor al AZC que las células que expresaban la versión silvestre de Rsp5 (Rsp5^{WT}) sugiriéndose que la variante T357A de Rsp5 previene el transporte de AZC al interior celular (Figura 32).

Con el objetivo de investigar una posible interacción genética entre las quinasas Hal4 y Hal5 y la ubiquitina ligasa Rsp5, de la misma manera que hicimos con la cepa silvestre, transformamos la cepa *hal4 hal5* con los plásmidos centroméricos que portan la versión silvestre o mutadas de Rsp5. Realizamos ensayos de crecimiento de estas cepas en medio sólido con AZC (Figura 32). En primer lugar se observa que a diferencia con la cepa silvestre, la cepa *hal4 hal5* ya es tolerante al AZC. En segundo lugar observamos que la cepa *hal4 hal5* transformada con la versión de Rsp5 que mimetiza la fosforilación (T357D) y por tanto reduce la actividad de Rsp5, también es tolerante al AZC, mientras que, sin embargo, la cepa *hal4 hal5* transformada con la versión activa de Rsp5 (T357A) presenta un retraso en su crecimiento con respecto a las otras cepas.

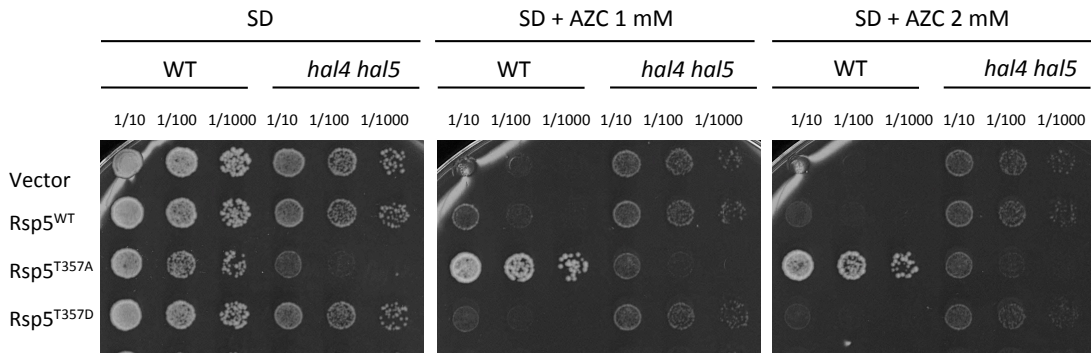


Figura 32. Ensayos de crecimiento con el análogo tóxico de la prolina AZC de una cepa silvestre y *hal4 hal5* transformadas con los plásmidos que portan la versión silvestre de Rsp5 así como las versiones mutadas T357A y T357D. Fenotipos de crecimiento de células de *S. cerevisiae* del fondo genético W303-1A de una cepa WT y de una cepa mutante *hal4 hal5* transformadas con los siguientes plásmidos centroméricos: pRS416 (Vector), pRS416-RSP5 (Rsp5), pRS416-RSP5^{T357A} (Rsp5^{T357A}) y pRS416-RSP5^{T357D} (Rsp5^{T357D}). Las células se crecieron hasta saturación en medio mínimo suplementado con KCl 0.1 M. Posteriormente se realizaron diluciones seriadas y se depositaron en los medios indicados. En todos los casos estos medios se suplementaron con KCl 0.1 M, leucina, histidina, triptófano y adenina. Se tomaron imágenes después de 48-72 horas de incubación a 28°C. Se analizaron más de tres clones independientes.

El hecho de que el mutante *hal4 hal5* sea tolerante al AZC, tanto cuando está transformado con el vector vacío como con la versión silvestre de Rsp5, indica que debe de haber una disminución del acumulo de las permeasas encargadas del transporte de prolina (y por tanto de AZC), igual que ocurre con otros transportadores de aminoácidos como Can1 o Mup1. El hecho también de que la versión menos activa de Rsp5 (T357D) no origine en una cepa *hal4 hal5* un fenotipo de sensibilidad al AZC, sugiere que la ausencia de Hal4 y Hal5 es dominante sobre el efecto de este mutante de Rsp5. Estos datos indican que Hal4 y Hal5 trabajan en una ruta independiente de Rsp5, aunque también podrían sugerir la existencia de otros sitios de fosforilación regulados por las quinasas Hal4 y Hal5 y que también inactivarían a Rsp5, ya que serían dominantes sobre la modificación en la treonina 357. Por otro lado, la versión activa de Rsp5 (T357A), a diferencia con una cepa WT a la que proporciona tolerancia al AZC, parece que genera un arresto en el crecimiento en la cepa *hal4 hal5* con independencia de la presencia o no de AZC en el medio. La expresión de la versión más activa de Rsp5 en una cepa *hal4 hal5* debe estar produciendo un aumento en la degradación vacuolar de las permeasas que transportan prolina y probablemente de otras permeasas de una forma tan dramática que compromete la toma de nutrientes, aunque no se pueden descartar otros mecanismos.

También analizamos el crecimiento de estas mismas cepas en medio solido *Translucent* con concentraciones de potasio limitante. El medio *Translucent* consiste en un medio mínimo que está compuesto de un YNB (*Yeast Nitrogen Base*) que ha sido reformulado para contener cantidades muy bajas de potasio (< 15 μM). Este experimento así como el resto de experimentos que también emplearon este medio, y que se describen a lo largo de este trabajo de Tesis Doctoral, se basaron en una

publicación del 2012 (Kham et al., 2012) donde midieron la concentración interna de K^+ en células de la cepa silvestre cultivadas en medio *Translucent* con diferentes concentraciones externas de KCl. Estos autores observaron que la concentración por encima de 5 mM de KCl del medio mínimo SD no es considerada una concentración de potasio limitante para cepas como la WT que no presentan defectos en la toma de potasio. Además, el crecimiento de células silvestres en este medio suplementado con concentraciones por debajo de 0.1 mM conlleva a una disminución de la cantidad de potasio interno a un tercio (300 mM en medios con K^+ no limitante vs. 100 mM en medios con $K^+ < 0.1$ mM).

Realizamos el experimento en medio *Translucent* para comprobar si una versión menos activa de Rsp5 (Rsp5^{T357D}) podría actuar como dominante negativo inhibiendo la acumulación vacuolar de permeasas y/o Trk1 y por tanto rescatar los fenotipos característicos del mutante *hal4 hal5*. Como se observa en la figura 33, el mutante *hal4 hal5* muestra un fenotipo dependiente de potasio con independencia de la versión del plásmido con la que ha sido transformada, y por tanto no observamos una mejora en el crecimiento en cepas expresando la versión menos activa de Rsp5. Sí se observa una ligera dependencia de potasio en la cepa silvestre transformada con la versión de Rsp5 activa (T357A), que indica que la mayor actividad de Rsp5 reduce la tasa de crecimiento en bajo potasio. Este resultado sugiere que los niveles de Trk1 podrían estar reducidos en esta cepa, aunque no se pueden descartar otras hipótesis.

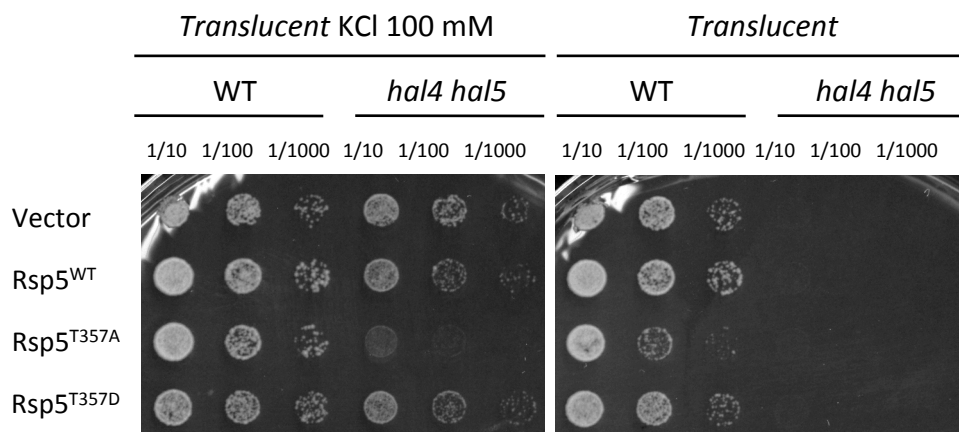


Figura 33. Ensayos de crecimiento en condiciones limitantes de KCl de una cepa silvestre y *hal4 hal5* transformadas con los plásmidos que portan la versión silvestre de Rsp5 así como las versiones mutadas T357A y T357D. Fenotipos de crecimiento en placas de medio *Translucent* con suplemento de KCl 100 mM y sin suplemento (KCl < 15 μ M) de las cepas indicadas. Las células se crecieron hasta saturación en medio mínimo suplementado con KCl 100 mM. Posteriormente se realizaron diluciones seriadas y se depositaron en los medios indicados. Se tomaron imágenes después de 48-72 horas de incubación a 28°C. Se analizaron más de tres clones independientes.

En resumen, en cuanto al fenotipo de resistencia a AZC, el mutante *hal4 hal5* tiene un comportamiento similar a cepas con la sobreactivación de Rsp5 (Rsp5^{T357A}). Sin embargo, nuestros datos indican que el sitio de fosforilación T357 de Rsp5 no parece

ser el responsable de los fenotipos del mutante *hal4 hal5* sugiriendo que las quinasas Hal4 y Hal5 podrían actuar fosfoinhibiendo Rsp5 en sitios adicionales. Cabe destacar que hay 9 sitios de fosforilación adicionales listados para Rsp5 en la base de datos de Phosphogrid (www.phosphogrid.org), aunque el único que ha sido estudiado en detalle es el de la T357. Otra posibilidad que consideramos más probable es que las quinasas Hal4 y Hal5 actúan en otro punto de esta ruta, como por ejemplo sobre la familia ARTs de adaptadores de Rsp5, como se ha descrito para Npr1, otra quinasa de la misma familia que Hal4 y Hal5 (MacGurn et al., 2011; O'Donnell et al., 2010).

3. Análisis genético de la posible implicación de la familia de adaptadores ARTs en la acumulación vacuolar de permeasas observada en el mutante *hal4 hal5*

En este apartado decidimos investigar si los fenotipos de acumulación vacuolar de los transportadores de la membrana observados en un mutante *hal4 hal5* son debidos a una posible alteración en la familia de proteínas ARTs, adaptadores de la E3 ubiquitina ligasa Rsp5.

Por su relación con el tráfico o con la regulación de la estabilidad de algunas proteínas de membrana y por un estudio bioquímico de fosforilación previo (Ptacek et al., 2005) que muestra que Art4 es una diana de fosforilación de Hal4, se llevó a cabo un estudio de interacción proteína-proteína entre Hal4 y las nueve proteínas de la familia ARTs mediante un ensayo de doble híbrido. Los resultados fueron negativos puesto que no observamos ninguna interacción física evidente utilizando esta técnica entre Hal4 y ninguna de las proteínas de la familia ARTs (datos no mostrados).

Decidimos realizar un abordaje genético alternativo debido a los resultados negativos obtenidos con el ensayo de doble híbrido y al hecho de que tampoco se observa interacción entre Art1 y la quinasa que lo regula, Npr1, con esta técnica (datos no mostrados; MacGurn et al., 2011). Puesto que se ha establecido que Art1 media la endocitosis de algunas permeasas como Can1 y Mup1, previamente descritas por estar afectadas en mutantes *hal4 hal5*, generamos la cepa triple mutante *hal4 hal5 art1*, como viene descrito en detalle en Materiales y Métodos (Lin et al., 2008; Perez Valle et al., 2007). Conviene destacar la dificultad de realizar modificaciones genéticas a mutantes *hal4 hal5*, sobre todo usando el gen de resistencia a kanamicina como sistema de selección. Hemos observado que el mutante *hal4 hal5* tiene una tasa muy alta de reversión fenotípica. Por esta razón, para generar el triple mutante, analizamos los fenotipos de 14 clones individuales los cuales se confirmaron por PCR y se repitieron los análisis en al menos dos clones diferentes.

Formulamos la hipótesis de que en ausencia de los genes que codifican para las quinasas *HAL4* y *HAL5*, el gen *ART1* codifica para el adaptador responsable de mediar la ubiquitinación de las permeasas de la membrana plasmática que se ven afectadas en mutantes *hal4 hal5*: Mup1, Can1 y Trk1. Por tanto, en los próximos apartados, describimos los resultados del análisis que llevamos a cabo en paralelo de estos tres transportadores en el mutante *hal4 hal5 art1*.

3.1. Estudio de la estabilidad de la permeasa Mup1 en una cepa triple mutante *hal4 hal5 art1* en diferentes condiciones

3.1.1. Estudio de la estabilidad de la permeasa Mup1 en condiciones de exceso de metionina en el medio

Como ya ha sido mencionado con anterioridad, ha sido descrito por algunos autores que la degradación vacuolar de Mup1 viene mediada por Art1 (Lin et al., 2008; Nikko and Pelham, 2009). En este apartado describimos el estudio de la estabilidad de la permeasa de metionina Mup1 en una cepa triple mutante *hal4 hal5 art1* en condiciones de exceso de su sustrato, metionina.

Para ello se transformaron la cepa silvestre y las cepas mutantes *art1*, *hal4 hal5* y *hal4 hal5 art1* con el plásmido pRS416-*MUP1*-GFP que se analizaron por microscopía confocal tras un tratamiento con metionina (Figura 34).

Como se observa en la figura 34, este tratamiento es suficiente para desencadenar la degradación de Mup1 en una cepa silvestre donde su localización es prácticamente vacuolar. Sin embargo, en una cepa mutante *art1*, Mup1 permanece en la membrana plasmática tras el tratamiento con metionina. Ello es debido a que en ausencia de este adaptador, ante un estímulo de metionina, la ubiquitinación mediada por Rsp5 y la posterior degradación de Mup1 disminuyen considerablemente. En una cepa *hal4 hal5* la degradación de Mup1 tiene lugar de una forma incluso más drástica que en una cepa silvestre, puesto que Mup1 presenta una localización estrictamente vacuolar. En la cepa de interés *hal4 hal5 art1*, aunque existe una degradación vacuolar *per se* de Mup1, podemos decir que la acumulación vacuolar inducida por metionina se previene. En esta cepa, tras este tratamiento con metionina, todavía se observa Mup1 en la membrana plasmática a diferencia con la cepa control *hal4 hal5*.

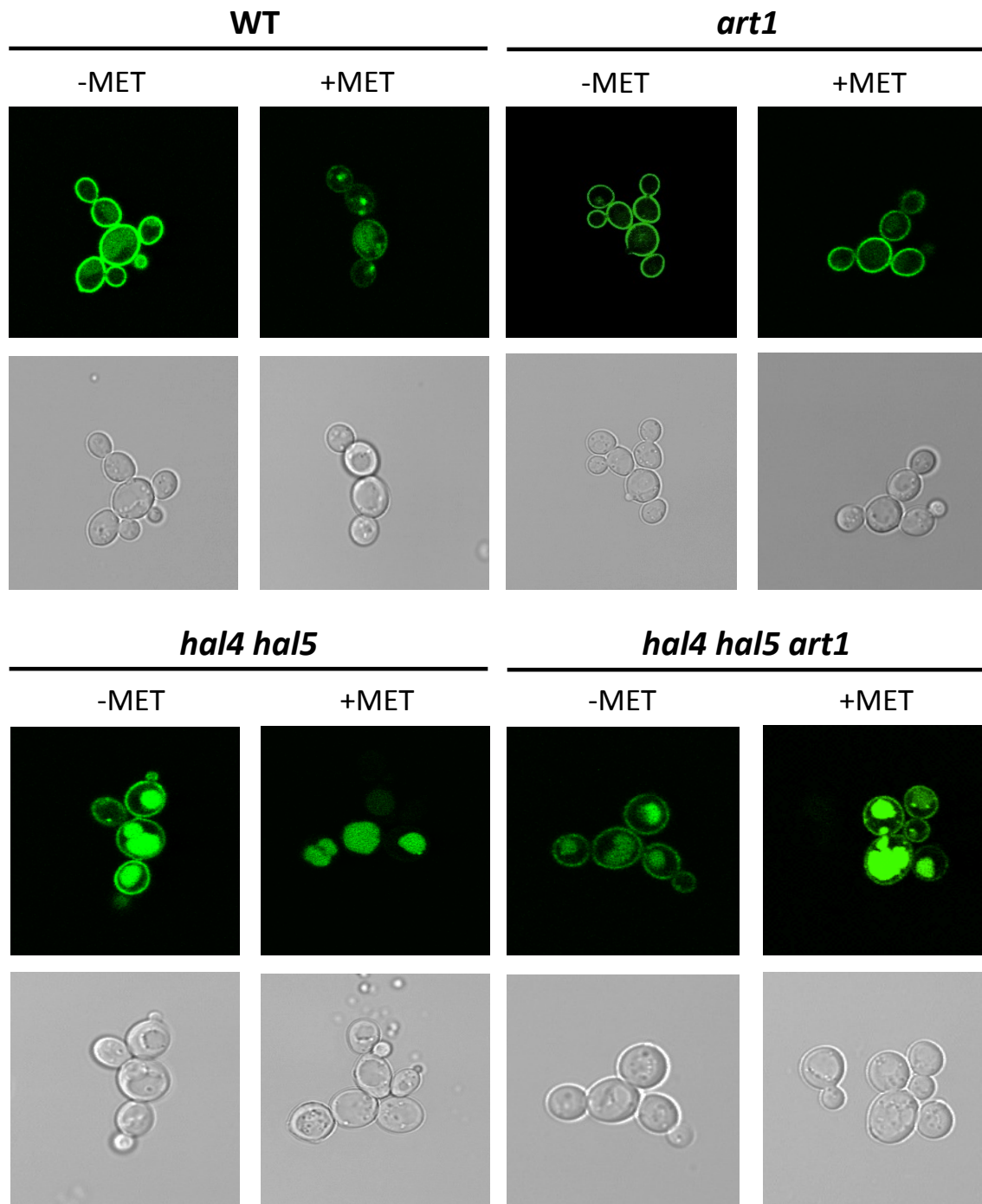


Figura 34. Localización subcelular de la permeasa de metionina Mup1-GFP en la cepa silvestre y en los mutantes *art1*, *hal4 hal5* y *hal4 hal5 art1* en condiciones de exceso de metionina. Imágenes obtenidas por microscopía confocal de la localización de la proteína de fusión Mup1-GFP en la cepa silvestre W303-1A, *art1*, *hal4 hal5* y *hal4 hal5 art1*. Las cepas transformadas fueron cultivadas hasta fase logarítmica en un medio mínimo suplementado con KCl 0.1 M. Posteriormente fueron tratadas durante 30 minutos con 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de metionina. Se muestran las imágenes más representativas de cada situación. Este experimento se realizó en tres clones independientes.

Estos resultados fueron confirmados mediante análisis *Western blot*, empleando un anticuerpo Anti-GFP para el análisis de la fracción insoluble (Figura 35). En ausencia de los genes *HAL4*, *HAL5* y *ART1* y ante un tratamiento de metionina observamos señal de Mup1-GFP en la fracción insoluble correspondiente a la membrana plasmática.

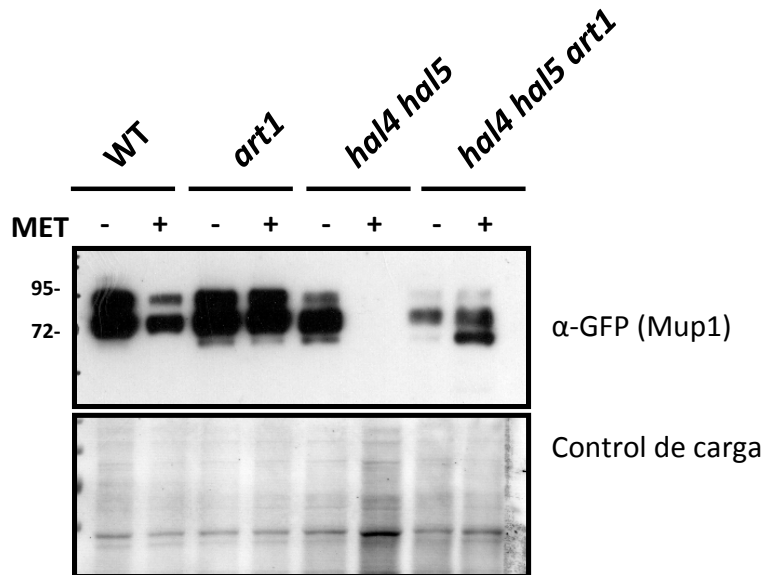


Figura 35. Análisis *Western blot* de la proteína Mup1 en la cepa silvestre y en los mutantes *art1*, *hal4 hal5* y *hal4 hal5 art1* en condiciones de exceso de metionina. La proteínas de la fracción insoluble se aislaron en las cepas indicadas expresando un plásmido con la proteína de fusión Mup1-GFP, tratadas como se ha descrito en la figura 34. El anticuerpo anti-GFP reconoce la fusión Mup1-GFP. Se muestra la tinción con *Direct Blue* como control de carga de proteínas. Los marcadores de peso molecular se muestran a la izquierda de la figura (kDa).

Por tanto, la ausencia de *ART1* impide la degradación vacuolar inducida por metionina de Mup1 en células WT y *hal4 hal5*. Cabe destacar también que se observan alteraciones en la acumulación y la movilidad electroforética de Mup1 en esta cepa triple mutante *hal4 hal5 art1*.

3.1.2. Estudio de la estabilidad de la permeasa Mup1 en condiciones de KCl limitante

En este apartado evaluamos la localización subcelular de Mup1 en una cepa mutante *hal4 hal5 art1* en condiciones de potasio limitante. La hipótesis planteada postula que en una cepa *hal4 hal5* el adaptador de la endocitosis y posterior degradación vacuolar de la permeasa Mup1, en condiciones de potasio limitante, es el adaptador Art1. Por tanto, esperaríamos observar que en condiciones limitantes de KCl, en ausencia de los genes *HAL4*, *HAL5* y *ART1*, la endocitosis y posterior tráfico a la vacuola de Mup1 quedaría bloqueada permaneciendo la proteína Mup1 estable en la membrana plasmática.

Empleamos las mismas cepas del apartado anterior que fueron cultivadas de forma idéntica hasta fase logarítmica en un medio mínimo SD suplementado con KCl 0.1 M (Figura 36).

En medio con suplemento de KCl, Mup1 permanece estable en la membrana plasmática en las cuatro cepas probadas, aunque cabe destacar que en los mutantes *hal4 hal5* y *hal4 hal5 art1* se observa también un alto contenido de GFP vacuolar, sugiriéndose una degradación constitutiva de Mup1 ante la ausencia de dichas quinasas. Posteriormente, tras someter las células a condiciones de potasio limitante, se observó una clara localización vacuolar de Mup1 en la cepa control *hal4 hal5*, tal y como había sido descrito anteriormente, así como en la cepa objeto de estudio *hal4 hal5 art1*. Por otro lado, en la cepa silvestre y en el mutante *art1*, la permeasa Mup1 permanece estable en la superficie celular. Estos resultados desbancan nuestra hipótesis de que Art1 sea el encargado de mediar la ubiquitinación dependiente de Rsp5 del transportador Mup1 en condiciones de potasio limitante.

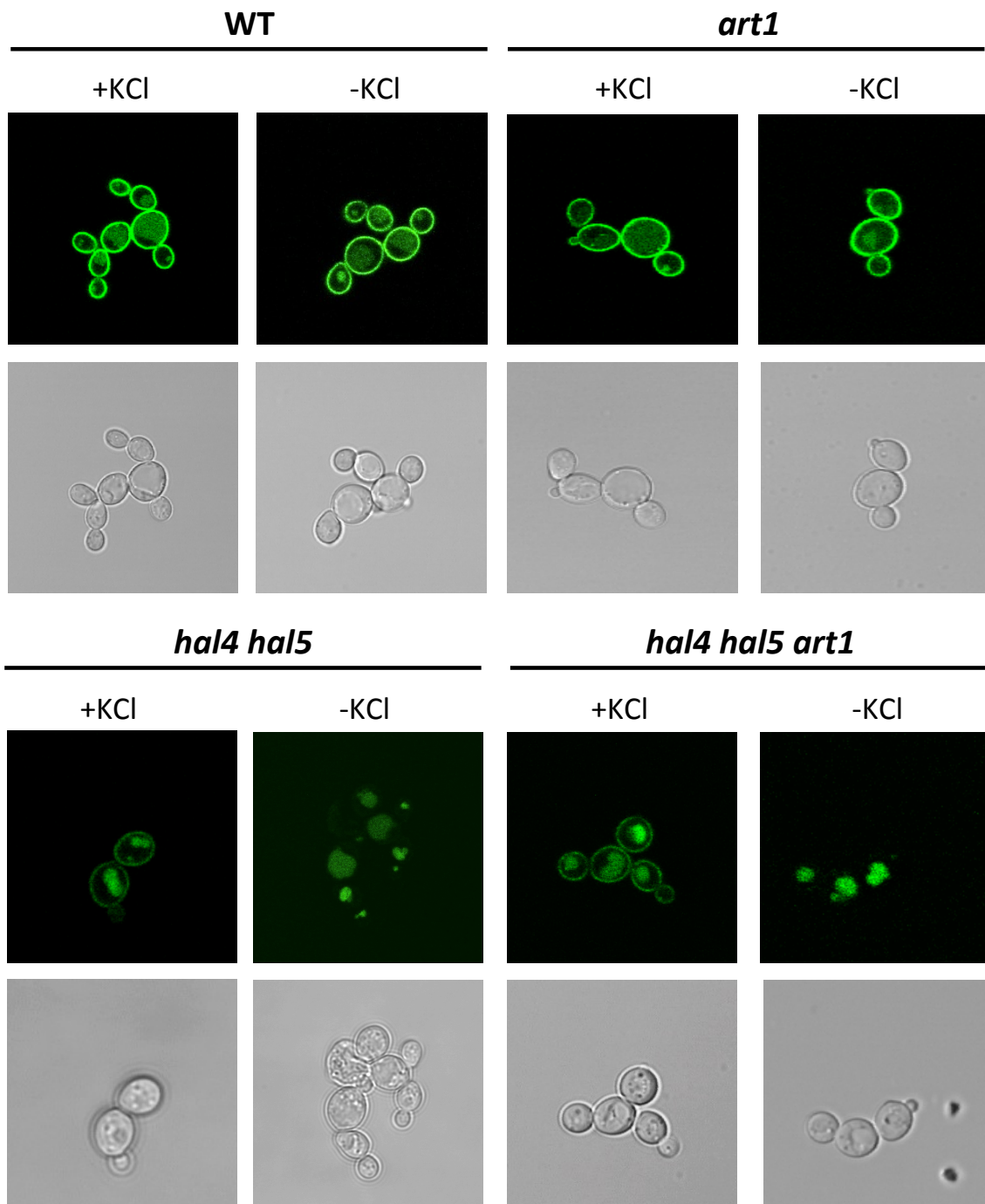


Figura 36. Localización subcelular de la permeasa de metionina Mup1-GFP en la cepa silvestre y en los mutantes *art1*, *hal4 hal5* y *hal4 hal5 art1* en condiciones de KCl limitante. Las cepas indicadas fueron transformadas con un plásmido que expresa la proteína de fusión Mup1-GFP, crecidas hasta fase logarítmica en medio mínimo suplementado con KCl 0.1 M y posteriormente lavadas y transferidas a medio mínimo sin suplemento de potasio durante 120 minutos. Estas células se analizaron por microscopía confocal. Se muestran las imágenes más representativas de cada situación. Este experimento se realizó en tres clones independientes.

Como se confirma mediante análisis *Western blot* (Figura 37), en ausencia de los genes *HAL4* y *HAL5* hay una reducción de la señal de Mup1-GFP en la membrana plasmática en condiciones de suplemento de KCl en el medio y que desaparece en medio sin suplemento de KCl.

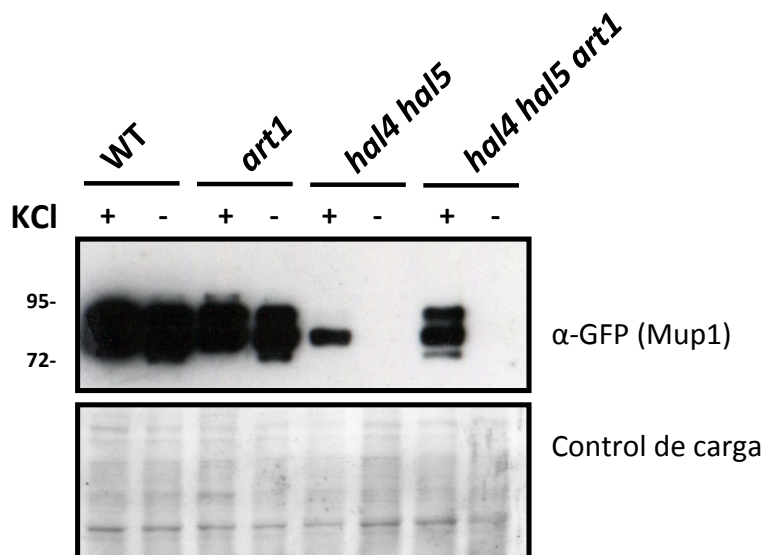


Figura 37. Análisis *Western blot* de la proteína Mup1 en la cepa silvestre y en los mutantes *art1*, *hal4 hal5* y *hal4 hal5 art1* en condiciones de KCl limitante. Las proteínas de la fracción insoluble se aislaron en las cepas indicadas expresando un plásmido con la fusión Mup1-GFP, tratadas como se ha descrito en la figura 36. El anticuerpo anti-GFP reconoce la fusión Mup1-GFP. Se muestra la tinción con *Direct Blue* como control de carga de proteínas. Los marcadores de peso molecular se muestran a la izquierda de la figura (kDa).

Aunque se ha visto que los genes *HAL4* y *HAL5* tienen un papel clave en el mantenimiento de la estabilidad de Mup1 en la membrana plasmática, *ART1* no se requiere para su internalización y posterior degradación vacuolar. Debido a la especificidad de la relación entre el *cargo* y el estímulo, así como de la redundancia de los ARTs, puede ser que en condiciones de potasio limitante en el medio el adaptador específico de Rsp5 que media la endocitosis de Mup1 sea otro diferente a Art1 o sea Art1 en colaboración con otros miembros de la familia.

3.2. Estudio de la estabilidad de la permeasa Can1 en una cepa triple mutante *hal4 hal5 art1* en diferentes condiciones

En paralelo a los estudios de la permeasa Mup1, analizamos el comportamiento de la permeasa de arginina codificada por el gen *CAN1*. Viene descrito en la literatura que la endocitosis de esta permeasa viene mediada por Art1 ante un estímulo de arginina o cicloheximida (Lin et al., 2008; Nikko and Pelham, 2009).

3.2.1. Estudio de la estabilidad de la permeasa Can1 en condiciones de exceso de arginina en el medio

A continuación se muestran las imágenes captadas por microscopía confocal de las células de la cepa silvestre y de las cepas mutantes *art1*, *ha4 hal5* y *hal4 hal5 art1*, previamente transformadas con el plásmido que porta la proteína de fusión Can1-GFP, y tratadas con arginina 0.02 mg/ml (Figura 38).

En un simple mutante *art1* y en un triple mutante *hal4 hal5 art1*, con el tratamiento de arginina, Can1 sigue localizándose en la membrana plasmática a diferencia de una cepa silvestre y de una cepa *hal4 hal5* donde Can1 se localiza mayoritariamente en la vacuola (Figura 38). Es decir, la ausencia del adaptador *ART1* disminuye la endocitosis y posterior degradación vacuolar de Can1 en condiciones de exceso de su sustrato arginina.

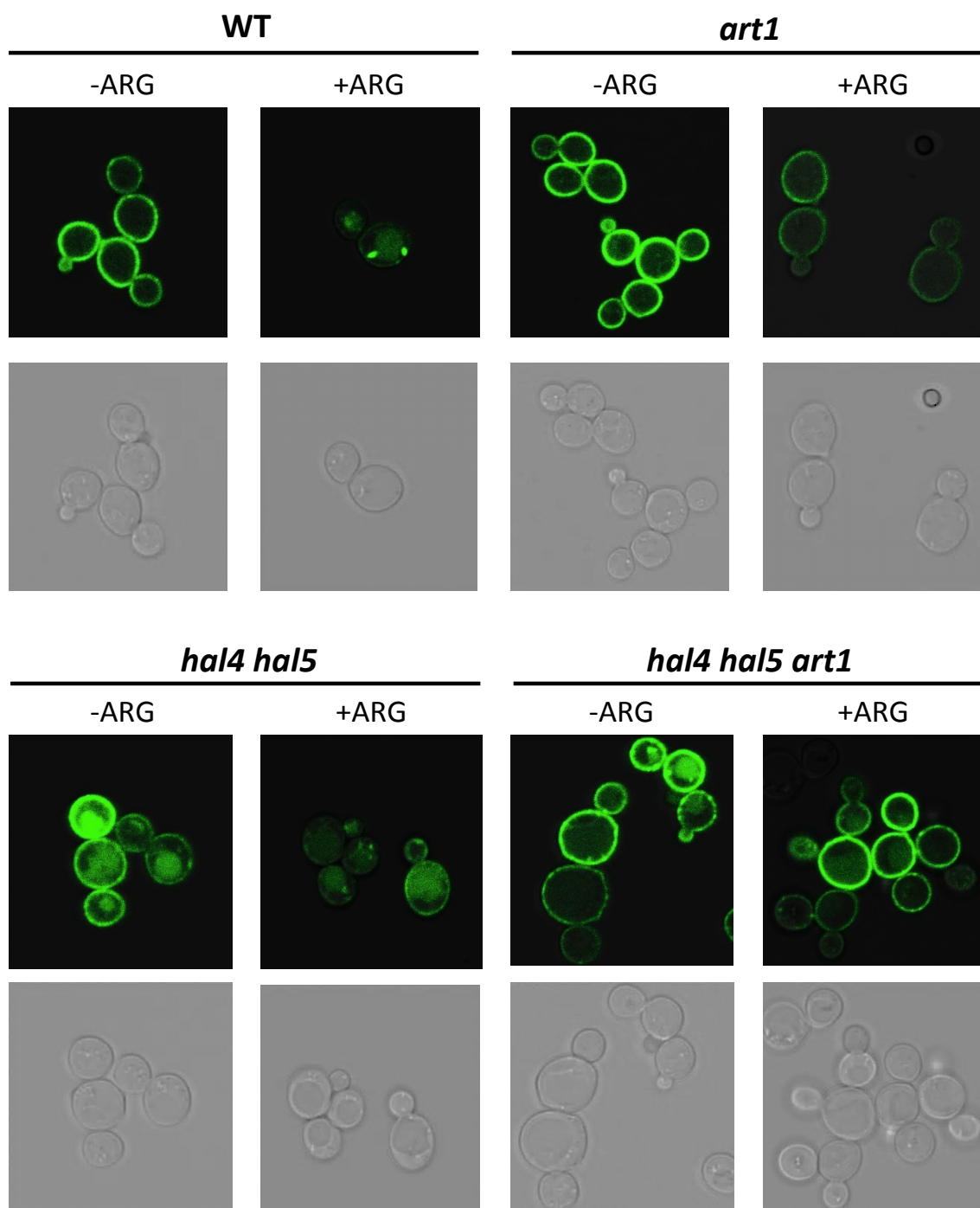


Figura 38. Localización subcelular de la permeasa de arginina Can1-GFP en la cepa silvestre y en los mutantes *art1*, *hal4 hal5* y *hal4 hal5 art1* en condiciones de exceso de arginina. Las cepas indicadas del fondo genético W303-1A fueron transformadas con un plásmido que expresa la proteína de fusión Can1-GFP, crecidas hasta fase logarítmica en medio mínimo suplementado con KCl 0.1 M y posteriormente tratadas con 0.02 mg/ml de arginina durante 120 minutos. Estas células fueron analizadas por microscopía confocal. Se muestran las imágenes más representativas de cada situación. Este experimento se realizó en tres clones independientes.

En el transcurso de estos experimentos observamos que las cepas *hal4 hal5 art1* presentan un defecto en el crecimiento en medio mínimo suplementado con aminoácidos (SCD), incluso en presencia de potasio (Figura 39). El medio SCD es un medio mínimo complementado con vitaminas y aminoácidos como la arginina, metionina o lisina. Además, también observamos un defecto en el crecimiento en medio SCD en los mutantes *art1* y *hal4 hal5* transformados con un plásmido para la sobreexpresión de *CAN1* (Figura 39). Cabe destacar que estos experimentos fueron realizados en el fondo genético W303-1A que carece del gen *CAN1*.

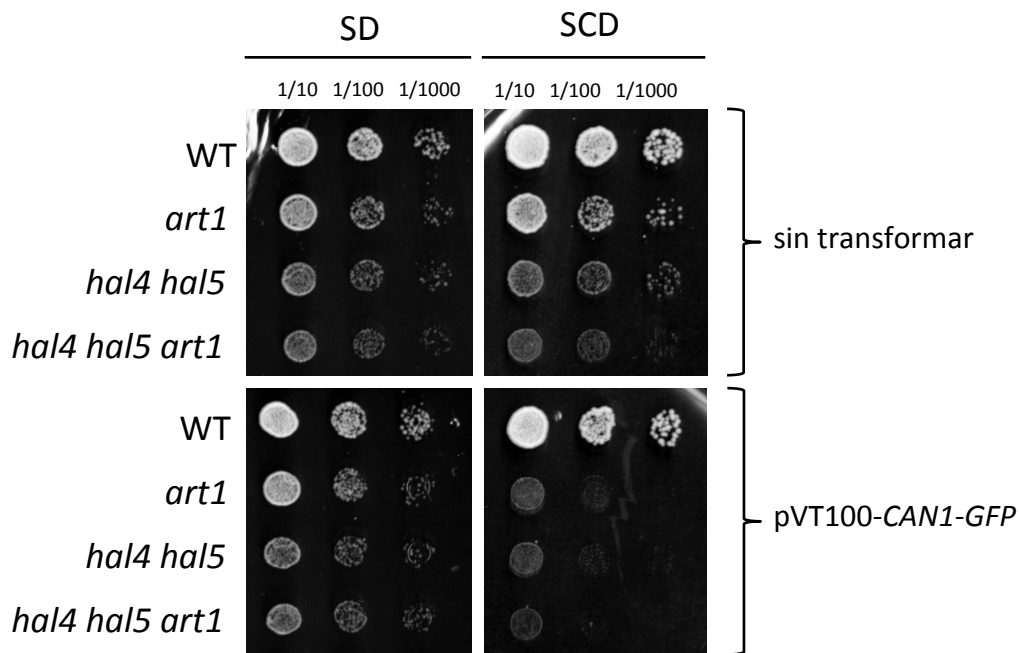


Figura 39. Ensayos de crecimiento en SD y SCD de cepas del fondo genético W303-1A transformadas con y sin el plásmido pVT100-CAN1-GFP. Fenotipos de crecimiento en placas de medio mínimo (SD) y medio mínimo complementado (SCD), ambas con suplemento de KCl 0.1 M, de la cepa WT y las cepas mutantes, *art1*, *hal4 hal5* y *hal4 hal5 art1* sin transformar y transformadas con el plásmido pVT100-CAN1-GFP. Las células se crecieron hasta saturación. Posteriormente se realizaron diluciones seriadas y se depositaron en placas sólidas de los medios indicados. Se tomaron imágenes después de 48-72 horas de incubación a 28°C. Este experimento se realizó en tres clones independientes.

Para investigar más sobre este fenotipo, cultivamos estas cepas en un medio SCD suplementado con KCl 0.1 M hasta fase logarítmica y las analizamos por microscopía confocal. En la figura 40 se indican los resultados obtenidos de este experimento.

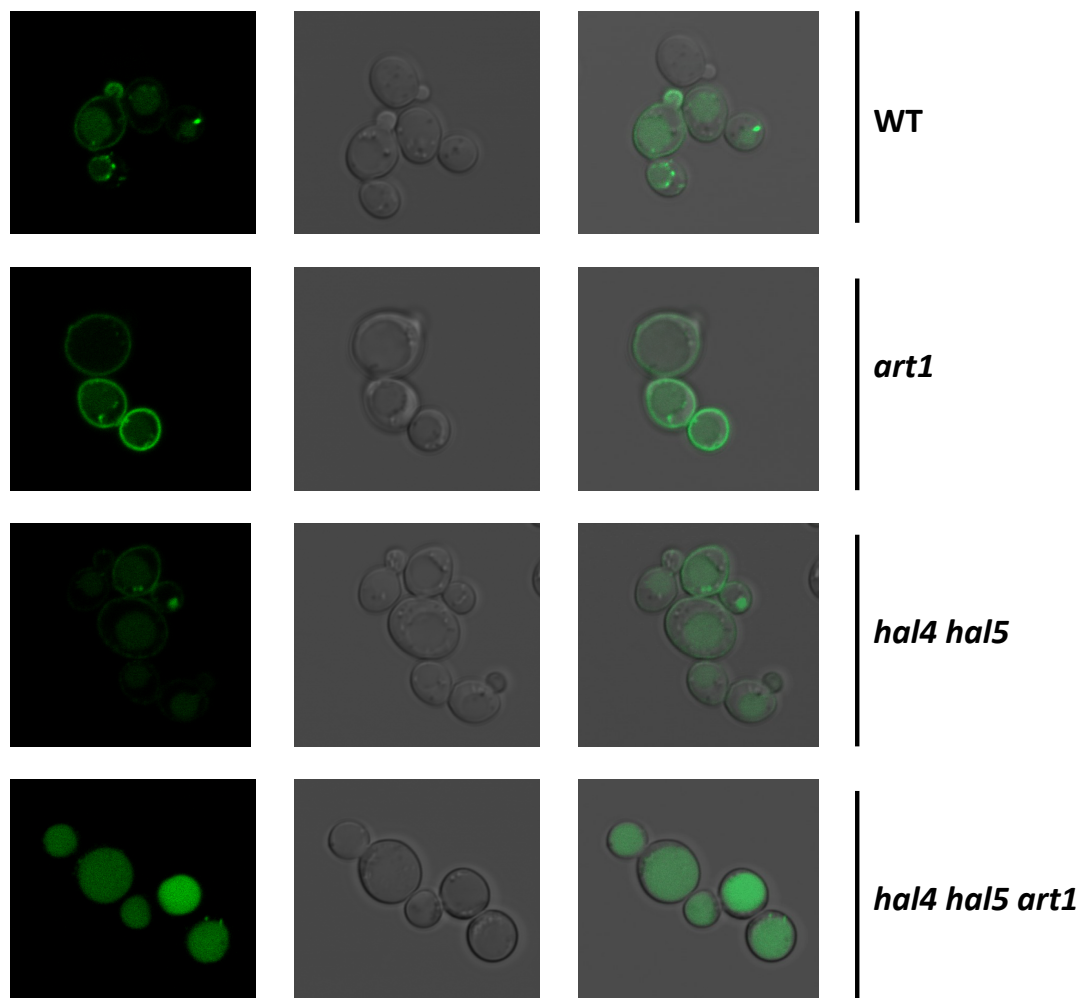


Figura. 40. Localización subcelular de la permeasa de arginina Can1-GFP en la cepa silvestre y en los mutantes *art1*, *hal4 hal5* y *hal4 hal5 art1* en medio SCD. Las cepas indicadas fueron transformadas con un plásmido que expresa la proteína de fusión Can1-GFP, crecidas hasta fase logarítmica en medio mínimo complementado (SCD) suplementado con KCl 0.1 M y analizadas por microscopía confocal. Se muestran las imágenes más representativas de cada situación. Este experimento se realizó en tres clones independientes. En este experimento se muestra la superposición de las imágenes del campo de fluorescencia y del campo claro para apreciar mejor el volumen vacuolar.

En células cultivadas en medio SCD, la acumulación vacuolar de Can1 queda prevenida en ausencia del adaptador Art1, sin embargo, en ausencia de las quinasas Hal4 y Hal5 sí se produce la acumulación vacuolar de esta permeasa. Por otro lado la localización de Can1-GFP es estrictamente vacuolar en una cepa triple mutante *hal4 hal5 art1*. El fenotipo de esta cepa es mucho más acusado que el de la cepa *hal4 hal5* sugiriéndose que las vías en las cuales trabajan las quinasas y Art1 están conectadas y/o son aditivas. Este resultado también revela un defecto importante en el control del volumen vacuolar en el triple mutante.

Con el fin de profundizar en estos resultados decidimos realizar ensayos de crecimiento adicionales en medio sólido con algunos de los aminoácidos formulados en el medio SCD. Nuestro objetivo era averiguar cuál de los aminoácidos

específicamente podría generar el defecto en el crecimiento en las cepas que carecían tanto del adaptador Art1 como de las quinasas Hal4 y Hal5. Decidimos probar específicamente la arginina, que es el aminoácido que (como ya hemos descrito) induce la internalización dependiente de Art1 de Can1. También decidimos probar la lisina y como control negativo la metionina, puesto que sabemos que la metionina es transportada específicamente por Mup1. El motivo para testar el aminoácido lisina se debe a que aunque este aminoácido entra específicamente por la permeasa Lyp1, la permeasa Can1 también puede transportar lisina ($K_m \sim 200 \mu\text{M}$ frente a $K_m \sim 10 \mu\text{M}$ para la arginina) (Grenson et al., 1966).

En la figura 41 se muestran los ensayos de crecimiento en medio mínimo de las cepas sin transformar y transformadas con el plásmido pVT100-CAN1-GFP con los aminoácidos individuales metionina, arginina y lisina, así como su combinación.

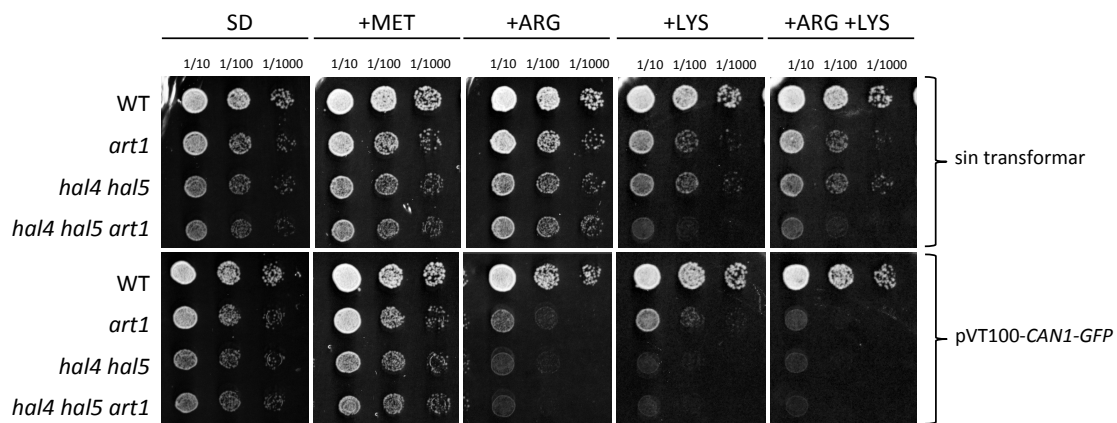


Figura 41. Ensayos de crecimiento en medio sólido SD suplementado con los aminoácidos metionina (MET), arginina (ARG) y lisina (LYS), así como la combinación arginina y lisina en cepas del fondo genético W303-1A sin transformar y transformadas con el plásmido pVT100-CAN1-GFP. Fenotipos de crecimiento en placas de medio mínimo con KCl 0.1 M y los aminoácidos metionina (0.02 mg/ml), arginina (0.02 mg/ml), lisina (0.02 mg/ml) y la combinación arginina y lisina de la cepa WT y las cepas mutantes *art1*, *hal4 hal5* y *hal4 hal5 art1*, sin transformar y transformadas con el plásmido pVT100-CAN1-GFP. Las células se crecieron hasta saturación. Posteriormente se realizaron diluciones seriadas y se depositaron en placas sólidas de los medios indicados. Se tomaron imágenes después de 48-72 horas de incubación a 28°C. Este experimento se realizó en tres clones independientes.

Las cepas carentes de los genes *HAL4* y *HAL5* y/o *ART1* y especialmente la cepa triple mutante *hal4 hal5 art1*, son sensibles al aminoácido lisina y no específicamente a través del transportador Can1, aunque su sensibilidad si se agrava cuando lo expresa. Por otro lado, en las cepas transformadas con el plásmido multicopia que porta la fusión Can1-GFP observamos que las cepas *art1*, *hal4 hal5* y *hal4 hal5 art1* son sensibles a la arginina. La mayor sensibilidad de estas tres cepas se observa con la combinación arginina y lisina.

Los fenotipos de crecimiento en los que la sensibilidad a la lisina se agrava en células que expresan el transportador Can1 podrían estar indicando la entrada del aminoácido

lisina a través de este transportador, además de su transportador específico Lyp1. Además, esta sensibilidad a lisina característica de las cepas que carecen del adaptador Art1 puede también estar sugiriendo una endocitosis de Can1 inducida por lisina y mediada por Art1. Sin embargo, el mecanismo de toxicidad de estos aminoácidos no está claro. El hecho de que son aminoácidos con carga neta positiva sugiere que podrían alterar el balance de cargas y por tanto afectar el potencial de membrana y/o alterar la composición del interior de la vacuola, como sugiere la morfología de las células observada por microscopia confocal que claramente muestran un incremento en el tamaño de la vacuola. De todos modos se requiere más investigación para determinar las causas de este fenotipo del mutante *hal4 hal5 art1*.

3.2.2. Estudio de la estabilidad de la permeasa Can1 en condiciones de KCl limitante

En este apartado se describe el estudio de la localización subcelular de la proteína de fusión Can1-GFP en estas cuatro cepas, con y sin suplementación de KCl (Figura 42).

Cuando hay potasio en el medio (+KCl), observamos que en estas cuatro cepas de estudio la permeasa de arginina Can1 presenta una correcta localización en la membrana plasmática. Cabe destacar que en la cepa *hal4 hal5* también observamos señal de GFP en la vacuola. Sin embargo, en condiciones de KCl limitante (-KCl), mientras que no se observan diferencias ni en la cepa silvestre ni en el mutante *art1* (con respecto a las condiciones de potasio en el medio), en las cepas que carecen de las quinasas Hal4 y Hal5 observamos una reducción en la cantidad de Can1 presente en la superficie celular que se correlaciona con un mayor contenido de GFP vacuolar.

Estos resultados fueron confirmados por análisis *Western blot* (datos no mostrados).

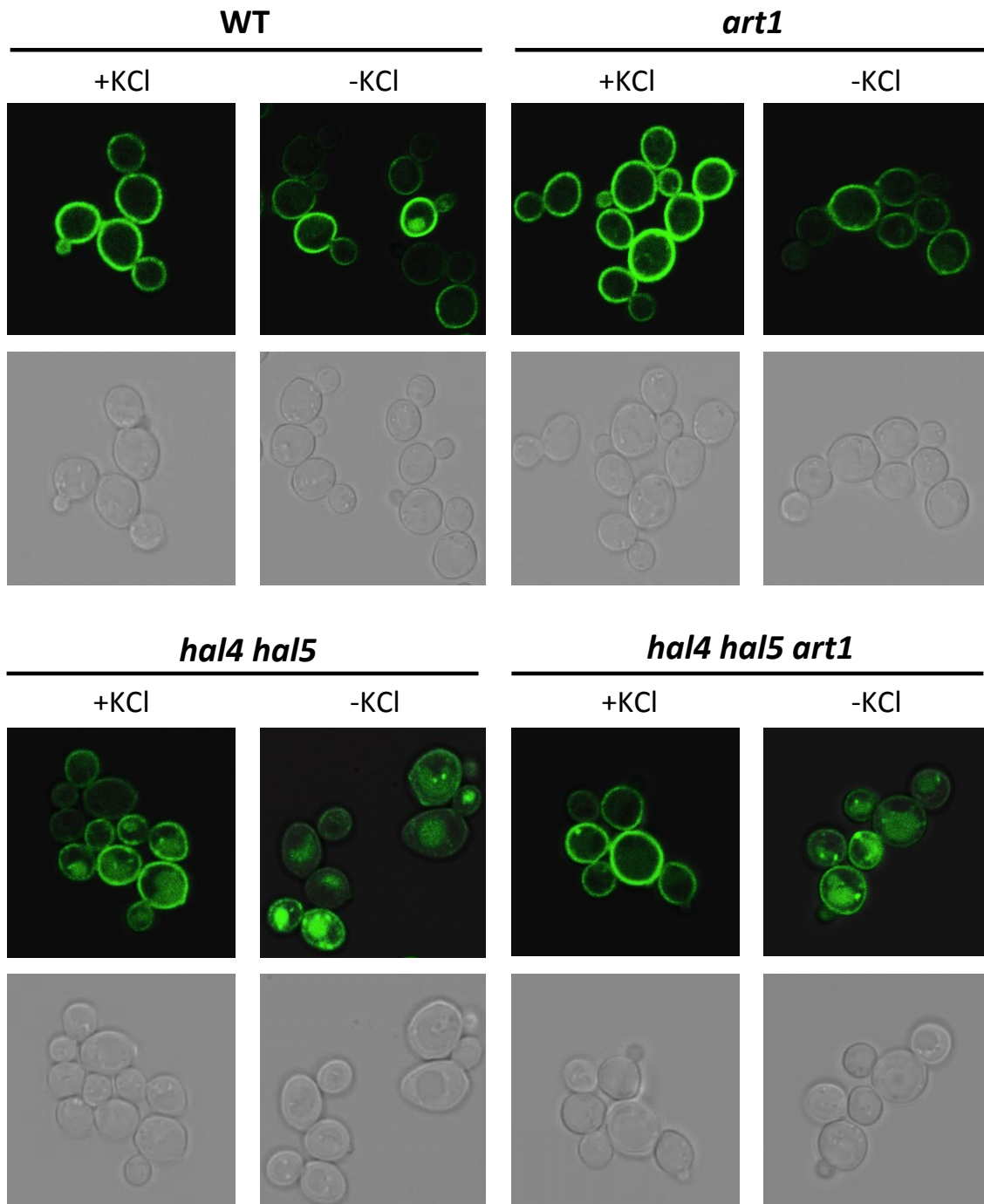


Figura 42. Localización subcelular de la permeasa de arginina Can1-GFP en la cepa silvestre y en los mutantes *art1*, *hal4 hal5* y *hal4 hal5 art1* en condiciones de KCl limitante. Las cepas indicadas fueron transformadas con un plásmido que expresa la proteína de fusión Can1-GFP, crecidas hasta fase logarítmica en medio mínimo suplementado con KCl 0.1 M y posteriormente lavadas y transferidas a medio mínimo sin suplemento de potasio durante 120 minutos. Estas células se analizaron por microscopía confocal. Se muestran las imágenes más representativas de cada situación. Este experimento se realizó en tres clones independientes.

Los resultados de este experimento indican que la acumulación vacuolar de Can1 en condiciones de KCl limitante en una cepa carente de las quinasas Hal4 y Hal5 no requiere el adaptador Art1.

3.3. Estudio de la estabilidad del transportador Trk1 en una cepa triple mutante *hal4 hal5 art1* en condiciones de KCl limitante

Para completar este apartado, también analizamos en paralelo el comportamiento del transportador Trk1 en la cepa silvestre y en los mutantes *art1*, *hal4 hal5* y *hal4 hal5 art1* en condiciones de sin y con suplemento de potasio, por *Western blot* (Figura 43).

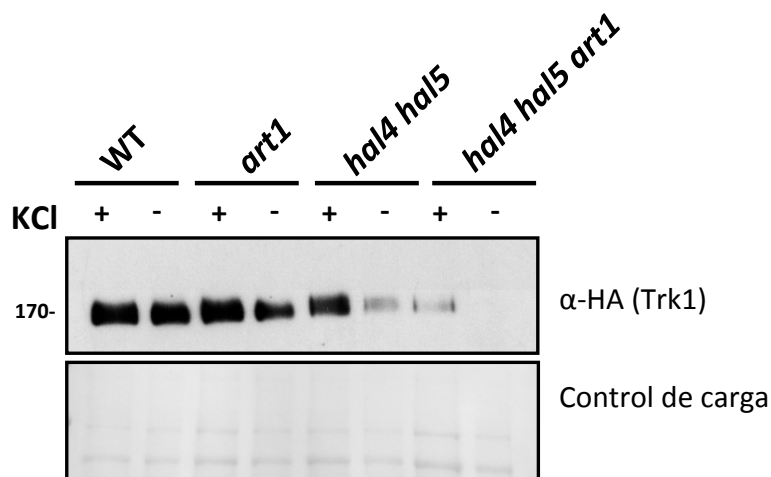


Figura 43. Análisis *Western blot* de la proteína Trk1 en la cepa silvestre y en los mutantes *art1*, *hal4 hal5* y *hal4 hal5 art1* en condiciones de KCl limitante. Las proteínas de la fracción insoluble se aislaron en las cepas indicadas del fondo genético W303-1A expresando un plásmido con la proteína de fusión Trk1-HA. Estas células fueron crecidas hasta fase logarítmica en medio mínimo suplementado con KCl 0.1 M y posteriormente lavadas y transferidas a medio mínimo sin suplemento de potasio durante 120 minutos. El anticuerpo anti-HA reconoce la fusión Trk1-HA. Se muestra la tinción con *Direct Blue* como control de carga de proteínas. Los marcadores de peso molecular se muestran a la izquierda de la figura (kDa). Observamos resultados similares en 3 clones independientes.

En las cepas mutantes para las quinasas Hal4 y Hal5, la cantidad de Trk1 presente en la fracción insoluble especialmente en condiciones limitantes de KCl decrece, confirmando los resultados publicados (Perez-Valle et al., 2007). También observamos un descenso de Trk1 en la cepa *hal4 hal5 art1* tanto en presencia del suplemento de potasio como en condiciones de KCl limitante. Estos resultados son muy interesantes y sugieren un papel para Art1 en la acumulación de Trk1 en la membrana plasmática, al menos en el fondo genético *hal4 hal5*. Esperábamos observar justo lo contrario, si Art1 fuera necesario para la ubiquitinación de Trk1 por Rsp5. No obstante, este resultado vuelve a sugerir un papel para este sistema de señalización (Rsp5-ARTs) en la ruta de señalización donde actúan Hal4 y Hal5.

Para resumir este bloque de experimentos, hemos observado que tanto Can1 y Mup1 requieren Art1 para su internalización en respuesta a exceso de sustrato, confirmando datos publicados. Sin embargo, Art1 no se requiere para la internalización de Can1, Mup1 ni Trk1 en condiciones de potasio limitante en el mutante *hal4 hal5*. No

obstante, en todos los casos, bien la movilidad electroforética o la cantidad de proteína son diferentes en el mutante *hal4 hal5 art1*. A la vista de los resultados podemos confirmar que aunque Art1 no media la internalización de estos transportadores en ausencia del suplemento de potasio, los efectos de estos mutantes son aditivos.

3.4. Estudio de la estabilidad de la permeasa Dip5 en una cepa mutante *hal4 hal5* en condiciones de potasio limitante

Hasta ahora la estabilidad de las permeasas de aminoácidos que habían sido analizadas por nuestro grupo en una cepa *hal4 hal5* dependía de Art1. En este apartado tratamos de identificar si este efecto desestabilizador de las permeasas en una cepa *hal4 hal5* es dependiente del adaptador o si por el contrario observamos el mismo efecto en otras permeasas de nutrientes cuya endocitosis venga mediada por otro miembro de la familia ARTs diferente a Art1.

Analizamos la estabilidad de la permeasa de ácido aspártico/glutámico Dip5 en una cepa *hal4 hal5*. La endocitosis de esta permeasa viene mediada por los miembros de la familia ARTs, Art3 y Art6, especialmente en condiciones de exceso de su sustrato ácido aspártico (Hatakeyama et al., 2010; O'Donnell et al., 2013).

Una vez transformamos las cepas silvestre y *hal4 hal5* con el plásmido que porta el gen *DIP5* fusionado a la etiqueta V5, se evaluó por *Western blot* la localización subcelular de la proteína Dip5 en condiciones de con y sin suplemento de potasio (Figura 44).

En condiciones limitantes de KCl, la cepa silvestre presenta una reducción de la proteína Dip5 en la fracción insoluble que se mantiene estable con tiempos mayores de tratamiento (datos no mostrados). Sin embargo, en una cepa *hal4 hal5*, a diferencia con otras permeasas estudiadas, se observa una acumulación de Dip5 en la fracción insoluble.

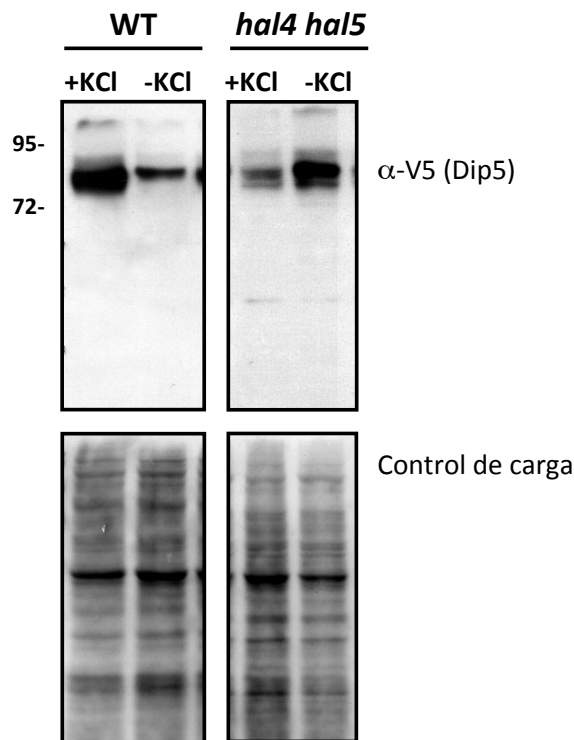


Figura 44. Análisis *Western blot* de la proteína Dip5 en la cepa silvestre y en la cepa mutante *hal4 hal5* en condiciones de KCl limitante. Las proteínas de la fracción insoluble se aislaron en las cepas indicadas del fondo genético BY4741 expresando un plásmido con la fusión Dip5-V5. Estas células fueron crecidas en medio mínimo suplementado con KCl 0.1 M. Una vez en fase logarítmica se añadió CuSO_4 (100 μM) al medio para inducir la expresión del gen *DIP5*. Tras 90 minutos de inducción, las células se transfirieron a un medio SD sin suplemento de KCl y se tomaron muestras a tiempo 0 y 120 minutos. El anticuerpo anti-V5 reconoce la fusión Dip5-V5. Se muestra la tinción con *Direct Blue* como control de carga de proteínas. Los marcadores de peso molecular se muestran a la izquierda de la figura (kDa). Observamos resultados similares en más de 3 clones independientes.

Como en casos anteriores, analizamos también la localización subcelular de este transportador por microscopía confocal con y sin suplemento de potasio (Figura 45).

En células de la cepa silvestre Dip5 se localiza en la membrana plasmática en ambas condiciones, aunque la cantidad de Dip5 es ligeramente menor en condiciones limitantes de KCl tal y como ya hemos observado por análisis *Western blot* (Figura 44). También observamos un alto contenido de GFP vacuolar en ambas condiciones. Sin embargo, en una cepa mutante *hal4 hal5*, en contra de lo que esperábamos tras el análisis *Western blot* (Figura 44), Dip5 no se localiza en la membrana plasmática si no que se localiza en estructuras membranosas que parecen vesículas. A tiempos más largos Dip5 muestra una localización estrictamente vacuolar (datos no mostrados).

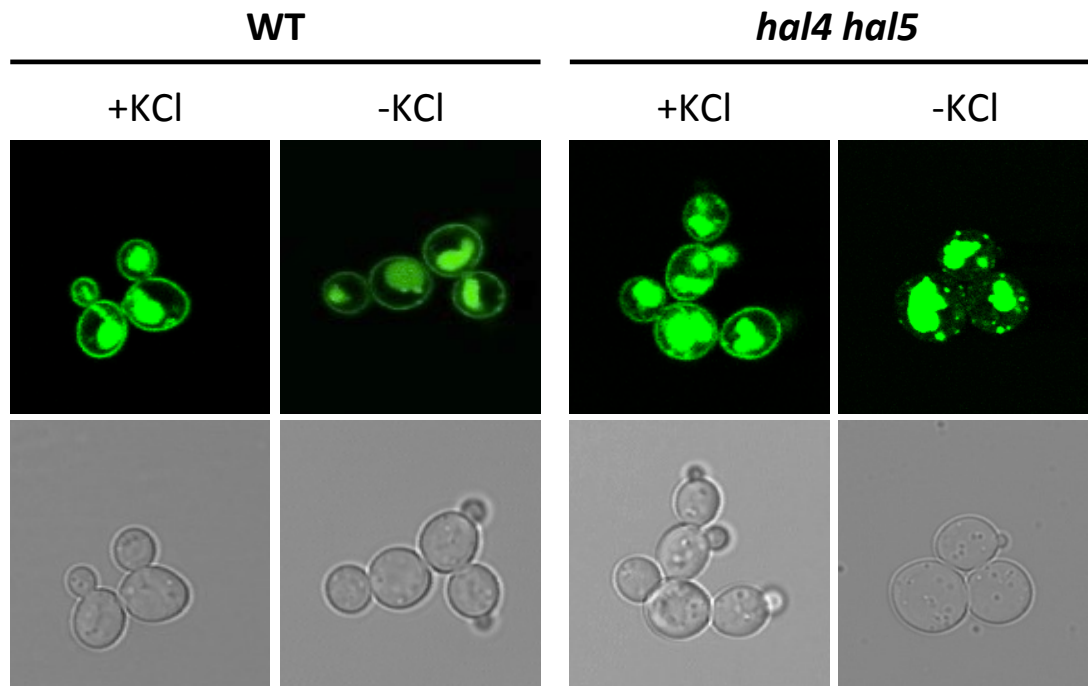


Figura 45. Localización subcelular de la permeasa de ácido aspártico/glutámico Dip5-GFP en la cepa silvestre y en la cepa mutante *hal4 hal5* en condiciones de KCl limitante. Las cepas indicadas del fondo genético BY4741 fueron transformadas con un plásmido que expresa la proteína de fusión Dip5-GFP, crecidas hasta fase logarítmica en medio mínimo suplementado con KCl 0.1 M y posteriormente lavadas y transferidas a medio mínimo sin suplemento de potasio durante 120 minutos. Estas células se analizaron por microscopía confocal. Se muestran las imágenes más representativas de cada situación. Observamos resultados similares en 3 clones independientes.

También analizamos en paralelo la estabilidad de Dip5 y Mup1 en una cepa *hal4 hal5* en condiciones limitantes de potasio. Observamos que la tasa de internalización de Dip5 es inferior a la tasa de internalización de la permeasa Mup1; a tiempo 45 minutos de cultivo en medio sin suplemento de potasio, no se observa señal de Mup1-GFP en la fracción insoluble mientras que sí hay señal de Dip5-GFP (datos no mostrados).

Estos resultados parecen indicar que en una cepa carente de las quinasas Hal4 y Hal5, la degradación vacuolar de Dip5 está retrasada con respecto a otras permeasas estudiadas en esta misma cepa. Este fenotipo encaja con el papel regulador de la estabilidad de las permeasas propuesto para las quinasas Hal4 y Hal5, ya que en una cepa *hal4 hal5* en condiciones limitantes de KCl Dip5 no es estable en la membrana plasmática, iniciándose su degradación vacuolar (de la misma manera que con otras permeasas estudiadas).

También analizamos la localización subcelular de Dip5 en una cepa *hal4 hal5* en condiciones de exceso de su sustrato (que induce su degradación vacuolar). Observamos que también en este caso parte de Dip5 permanece en la fracción insoluble (datos no mostrados). Este resultado parece indicar que también en

condiciones de exceso de su sustrato la degradación vacuolar de Dip5 queda alterada en una cepa doble mutante *hal4 hal5*.

Estos resultados son consistentes con un mecanismo general en el que las quinasas Hal4 y Hal5 participan en la regulación de la estabilidad de los transportadores de la membrana plasmática. Además, hemos identificado que este mecanismo afecta a transportadores cuya acumulación vacuolar en condiciones de exceso de su sustrato viene mediada por distintos miembros de la familia ARTs. De forma interesante, en este caso hemos observado sin embargo que el mecanismo regulador no es idéntico al de otros transportadores como Can1, Mup1 o Trk1, puesto que se observa un fenotipo que afecta al tráfico de manera diferente. En la cepa *hal4 hal5*, mientras que los transportadores Can1, Mup1 y Trk1 se localizan mayoritariamente en la vacuola, en el caso del transportador de Asp/Glu Dip5, éste queda retenido en vesículas en su camino hacia la vacuola, un fenotipo similar al de los mutantes *vps* de clase E (una acumulación de compartimentos pre-vacuolares de tipo endosomal) (Raymond et al., 1992). Por tanto, hemos identificado otra permeasa cuya acumulación se ve afectada en el mutante *hal4 hal5* la cual se regula no por Art1 sino por Art3 y Art6.

La familia de adaptadores ARTs es una familia de proteínas que presenta alta redundancia. En el caso del transportador de manganeso Smf1, su ubiquitinación viene mediada por el par de adaptadores Art2 y Art8. También la ubiquitinación del transportador Dip5 viene mediada por los dos adaptadores Art3 y Art6 (Hatakeyama et al., 2010; O'Donnell et al., 2013). De manera similar, el tráfico de Gap1 viene mediado por estos mismos adaptadores Art3 y Art6. Ante este panorama que evidencia un difícil abordaje genético en la identificación del miembro o miembros de la familia ARTs encargados de mediar la degradación vacuolar de las diferentes permeasas en ausencia de las quinasas Hal4 y Hal5, decidimos evaluar otro componente regulador de esta ruta de señalización aguas arriba de los ARTs.

4. Estudio de la posible implicación de las quinasas Hal4 y Hal5 en la ruta de señalización TORC1

Como ha sido descrito en la Introducción, se ha demostrado que el complejo TORC1 modula la composición de las proteínas de la membrana plasmática al regular su endocitosis. Este mecanismo está mediado, al menos en parte, por la quinasa Npr1, un regulador negativo de dicha endocitosis que es a su vez regulado negativamente por TORC1 (MacGurn et al., 2011). Una posibilidad es que los fenotipos de inestabilidad de los transportadores de una cepa *hal4 hal5* sean debidos a una alteración en la ruta TORC1.

4.1. Estudio de la estabilidad de la permeasa Mup1 en células WT y *hal4 hal5* durante un tratamiento con rapamicina

En primer lugar, para determinar si existe una relación entre las quinasas Hal4 y Hal5 y la ruta de señalización TORC1 respecto a la regulación del tráfico de algunas permeasas, decidimos estudiar el efecto de la rapamicina (un potente inhibidor de la ruta TORC1) sobre la estabilidad de las permeasas en una cepa *hal4 hal5*. Concretamente decidimos estudiar la permeasa Mup1 por el hecho de que se ha establecido un modelo de regulación de su adaptador dependiente de TORC1 (MacGurn et al., 2011). Se ha demostrado que la endocitosis y el tráfico vacuolar inducido por CHX (activador de la ruta TORC1) de algunas permeasas de la membrana plasmática como Fur4 (uracilo) y Mup1 (metionina) se ve suprimido en presencia de rapamicina; estos resultados permiten postular un modelo que establece que cuando TORC1 está “apagado”, como ocurre durante un tratamiento con rapamicina o en condiciones de ayuno de nutrientes, Npr1 está activo y puede fosfoinhibir al adaptador Art1. Este adaptador fosforilado no puede mediar la ubiquitinación mediada por Rsp5 de sus dianas de la membrana plasmática quedando retenidas en ésta.

El análisis del efecto de la rapamicina sobre la estabilidad de la permeasa de metionina Mup1 en células silvestre y células mutantes *hal4 hal5* se muestra en la figura 46.

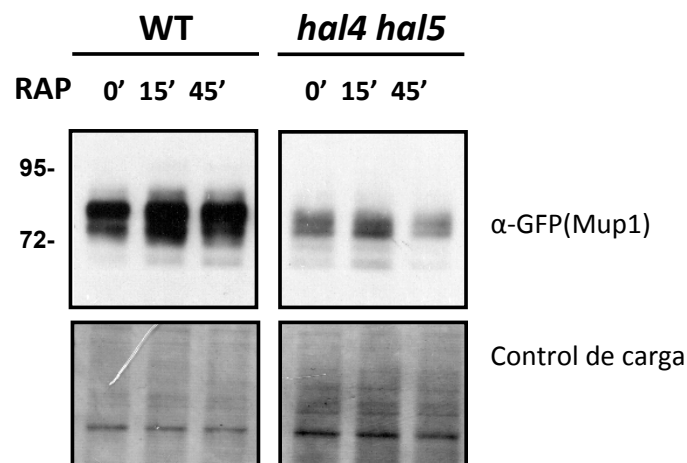


Figura 46. Análisis Western blot de la proteína Mup1 en la cepa silvestre y en la cepa mutante *hal4 hal5* ante un tratamiento con rapamicina. Las proteínas de la fracción insoluble se aislaron en las cepas del fondo genético W303-1A, WT y *hal4 hal5* expresando un plásmido con la proteína de fusión Mup1-GFP. Estas células fueron cultivadas hasta fase logarítmica en medio mínimo suplementado con KCl 0.1 M y posteriormente fueron tratadas con rapamicina a una concentración final de 200 ng/ml. Se tomaron muestras a tiempo 0, 15 y 45 minutos. El anticuerpo anti-GFP reconoce la fusión Mup1-GFP. Se muestra la tinción con *Direct Blue* como control de carga de proteínas. Los marcadores de peso molecular se muestran a la izquierda de la figura (kDa). Observamos resultados similares en 3 clones independientes.

Ante un tratamiento con rapamicina, en la cepa silvestre se observa una acumulación de Mup1 en la fracción insoluble, como ya había sido descrito (MacGurn et al., 2011). Sin embargo, en el caso de la cepa *hal4 hal5*, además de presentar menores niveles de

proteína que una cepa silvestre, no observamos ninguna acumulación de Mup1 o al menos una acumulación significativa durante este tratamiento con rapamicina. Parece que el mutante *hal4 hal5* no responde como la cepa silvestre al tratamiento con rapamicina en términos de acumulación de Mup1. Este resultado podría sugerir que el mutante *hal4 hal5* posee algún defecto en la actividad de la quinasa de la misma familia Npr1.

4.2. Regulación de Npr1 en una cepa *hal4 hal5*

4.2.1. Análisis *Western blot* de la acumulación y fosforegulación de la quinasa Npr1

La quinasa Npr1 representa un mediador importante en el control por TORC1 de la estabilidad de permeasas de nutrientes en levadura. El modelo de MacGurn del 2011 (como ya se ha comentado anteriormente) propone que Npr1 fosfoinhibe la función de Art1 y ello genera la acumulación de algunas permeasas en la membrana plasmática como Can1. Además, también se ha descrito que Npr1 regula Gap1 a través de Art3 y Art6 (O' Donnell et al., 2010). Por lo tanto, parece que la quinasa Npr1 posee un efecto pleiotrópico en el control de la degradación vacuolar de permeasas de aminoácidos en la levadura *S. cerevisiae*.

En base a los datos presentados, decidimos testar la expresión de la quinasa Npr1 en un mutante *hal4 hal5*. Establecimos la hipótesis de que los fenotipos de inestabilidad de los transportadores de la membrana plasmática observados en una cepa *hal4 hal5* fueran debidos a una alteración en la expresión y/o actividad de la quinasa Npr1.

Para ello transformamos la cepa silvestre y la cepa *hal4 hal5* con un plásmido centromérico en el que *NPR1* está bajo el control de su propio promotor y fusionado al epitopo HA. Cultivamos las células en medio mínimo suplementado con KCl 0.1 M hasta fase logarítmica y realizamos dos tratamientos distintos: tratamiento en condiciones limitantes de KCl y tratamiento con rapamicina. Cuando TORC1 se inactiva por condiciones de ayuno de nutrientes o por un tratamiento con rapamicina, Npr1 es desfosforilado y activado (Schmidt et al., 1998).

Se estudiaron los niveles de acumulación y el cambio en la movilidad electroforética de Npr1 por análisis *Western blot*.

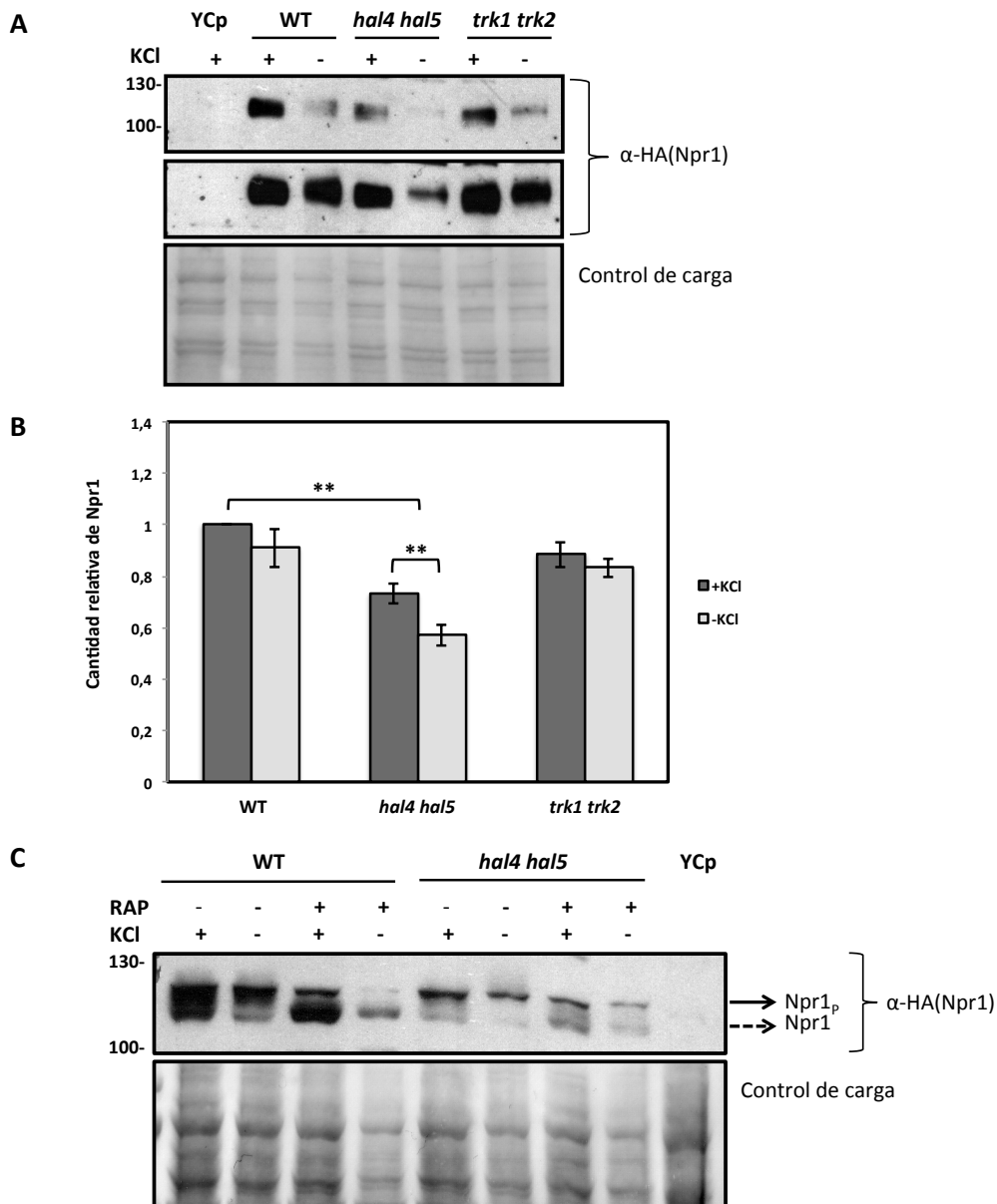


Figura 47. Análisis *Western blot* de la acumulación y alteración en la movilidad electroforética de la proteína Npr1 en las cepas silvestre, *hal4 hal5* y *trk1 trk2* en diferentes condiciones. Las cepas indicadas del fondo genético BY4741 fueron transformadas con el plásmido centromérico que porta la fusión Npr1-HA o el vector vacío (YCp). (A) Se evaluó por *Western blot* la expresión de la quinasa Npr1 en medio SD con (+) y sin (-) suplemento de KCl 0.1 M durante 30 minutos. Se muestran dos exposiciones distintas. El anticuerpo anti-HA reconoce la fusión Npr1-HA. Se muestra la tinción con *Direct Blue* como control de carga de proteínas. Los marcadores de peso molecular se muestran a la izquierda de la figura (kDa). (B) Cuantificación de los niveles de acumulación de la proteína Npr1 en las cepas y condiciones del panel A. Los valores indicados en la gráfica se calcularon como el cociente entre la señal de Npr1-HA y de la proteína total, obtenida por la tinción de la membrana. Se ha establecido como valor de referencia 1 a la muestra WT cultivada en medio mínimo con suplemento de KCl 0.1 M. Los gráficos muestran los valores medios y la desviación estándar de tres determinaciones independientes. Se llevó a cabo un análisis estadístico *t de Student*. El doble asterisco (**) indica que existe significación estadística con un valor $p < 0.01$. (C) Análisis del cambio en la movilidad electroforética de la proteína Npr1 en varias combinaciones de tratamientos: con (+) y sin (-) rapamicina (RAP) y con (+) y sin (-) KCl. La duración de ambos tratamientos fue de 30 minutos. Este experimento fue realizado en más de tres clones y con clones procedentes de transformaciones independientes, observando resultados similares en todos los casos.

En la figura 47 panel A, podemos observar como con independencia del tratamiento, en una cepa carente de las quinasas Hal4 y Hal5 la acumulación de Npr1 es menor que en una cepa silvestre. Se observa una reducción mayor en condiciones de potasio limitante. Sin embargo, en una cepa *trk1 trk2*, la acumulación de Npr1 no presenta alteraciones significativas con respecto a una cepa silvestre. Estos resultados fueron confirmados tras su cuantificación. En el panel B se muestran los valores de la cantidad relativa de la proteína Npr1 en ambas condiciones normalizada por el control de carga. Por otro lado, en el panel C se muestra el análisis de la fosforilación de Npr1 por su cambio en la movilidad electroforética en una cepa silvestre y en una cepa *hal4 hal5*. En este caso no se analizó la cepa *trk1 trk2* por que los valores de acumulación del panel A no mostraron evidencias de un fenotipo acusado con respecto a la cepa silvestre. Observamos que tras la inactivación de TORC1 con un tratamiento con rapamicina, tanto en células de la cepa silvestre como en células de la cepa *hal4 hal5*, Npr1 presenta menores niveles de fosforilación; aunque cabe destacar que parece que en la cepa carente de las quinasas Hal4 y Hal5 la desfosforilación no es tan eficiente como en células de la cepa silvestre. Aún así estos resultados sugieren que las quinasas Hal4 y Hal5 no son necesarias para la activación de Npr1 por desfosforilación.

En el caso de cultivar las células en condiciones de KCl limitante, sí observamos un cambio en la movilidad electroforética de Npr1 con respecto a las células cultivadas en medio mínimo con suplemento de KCl 0.1 M. Tanto en la cepa silvestre como en la cepa *hal4 hal5* en condiciones de KCl limitante observamos indicios de un incremento en la proporción de Npr1 que está fosforilado. Esta fosforilación resulta más acusada en el mutante *hal4 hal5*. Cabe destacar también que los niveles de fosforilación iniciales (medio con potasio) son superiores en una cepa *hal4 hal5* que en una cepa silvestre.

Se realizaron los mismos experimentos en el fondo genético W303-1A con idénticos resultados (datos no mostrados).

Los menores niveles de acumulación de Npr1 podrían explicar los fenotipos de inestabilidad de los transportadores de la membrana plasmática observados en la cepa *hal4 hal5*. Los resultados también muestran evidencias de una posible fosforilación de la quinasa Npr1 en condiciones de KCl limitante, especialmente en una cepa *hal4 hal5*.

Con el fin de evaluar con más precisión si la actividad de Npr1 también se ve alterada en condiciones de ayuno de KCl, decidimos realizar el mismo experimento en medio *Translucent* (KCl < 15 μ M).

Cultivamos las cepas WT y *hal4 hal5* (transformadas previamente con el plásmido centromérico que porta la fusión Npr1-HA) en medio *Translucent* suplementado con KCl 50 mM hasta fase logarítmica. Realizamos dos tratamientos distintos: medio con y sin KCl, además de los respectivos controles de fosforilación y desfosforilación con cicloheximida y rapamicina, respectivamente. En este caso, también empleamos un

método optimizado para la extracción de Npr1 fosforilado (método TCA) y su posterior resolución en gel. Dado los menores niveles de expresión de Npr1 observados en la cepa *hal4 hal5* cargamos más proteína con el fin de facilitar su visualización por *Western blot* (Figura 48).

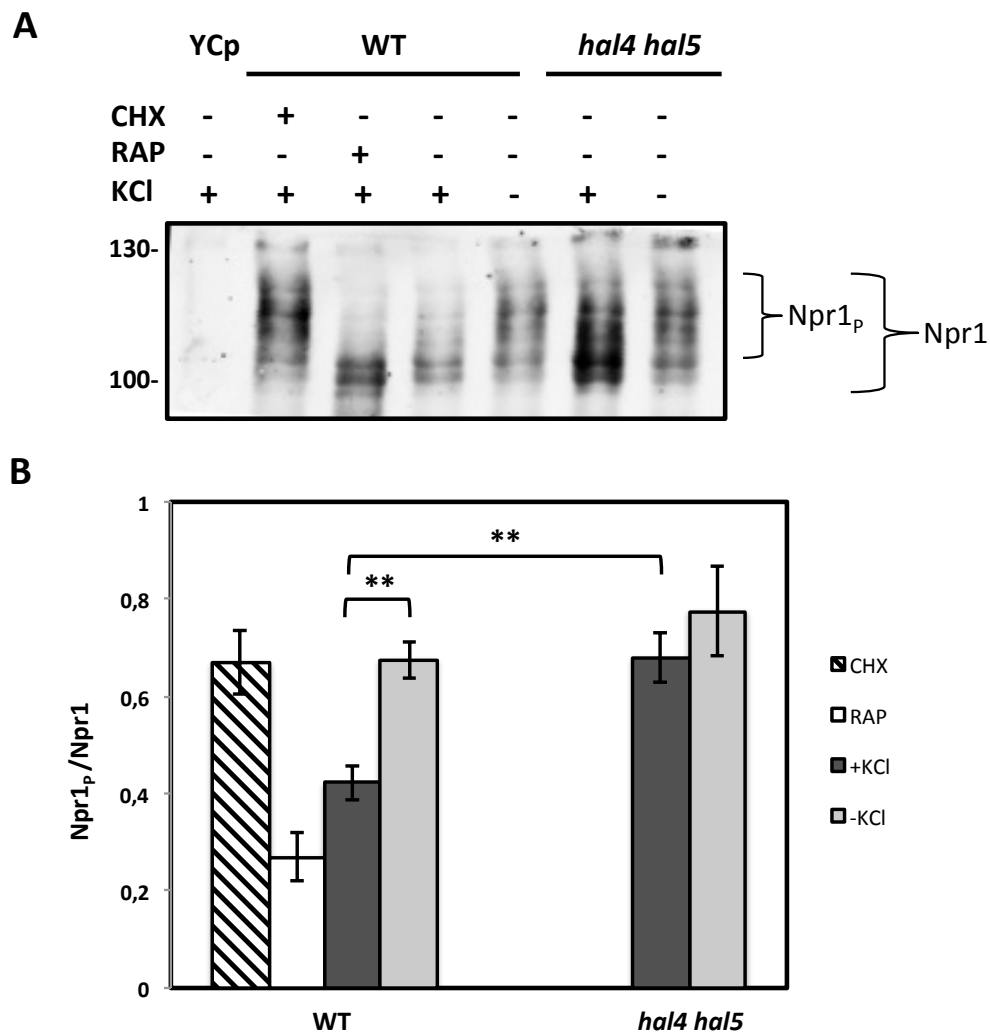


Figura 48. Análisis de la alteración en la movilidad electroforética de la proteína Npr1 en la cepa silvestre y en la cepa mutante *hal4 hal5* en condiciones de ayuno de potasio. Las cepas mencionadas en la figura 47 fueron cultivadas hasta fase logarítmica en medio *Translucent* suplementado con KCl 50 mM. Los tratamientos realizados fueron: con (+) y sin (-) rapamicina (RAP), con (+) y sin (-) cicloheximida (CHX) y con (+) y sin (-) KCl (ver Materiales y Métodos). Se tomaron muestras para su análisis *Western blot* que se extrajeron por el método del TCA (ver Materiales y Métodos). (A) Se analizó el cambio en la fosforilación de la quinasa Npr1 por alteración de su movilidad electroforética. El anticuerpo anti-HA reconoce la fusión Npr1-HA. Los marcadores de peso molecular se muestran a la izquierda de la figura (kDa). Este experimento se realizó en tres clones independientes. (B) Los valores de fosforilación de Npr1 se determinaron cuantificando por densitometría la banda correspondiente a Npr1 fosforilado con respecto a la proteína total, tomando como valor de fosforilación las bandas correspondientes a Npr1 en las células tratadas con cicloheximida. Los niveles de fosforilación se expresan como la media \pm el error estándar. Se llevó a cabo un análisis estadístico *t de Student* con los datos correspondientes a tres experimentos independientes. El asterisco (**) indica que existe significación estadística con un valor $p < 0.01$, respecto a la cepa control.

En la figura 48 panel A, podemos observar que la proteína Npr1 está hiperfosforilada en la cepa silvestre en condiciones de ayuno de potasio así como en el mutante *hal4 hal5* en ambas condiciones. La cuantificación de la fosforilación de Npr1 se muestra en el panel B.

Podemos afirmar por tanto que este efecto en la fosforilación de Npr1 es debido no sólo a la ausencia de las quinasas Hal4 y Hal5 sino también a la ausencia del KCl en el medio. Estos datos sugieren que los niveles de potasio intracelular podrían afectar al estado de activación del efector de la ruta TORC1 Npr1.

4.2.2. Análisis de la transcripción de *NPR1*

Tras los cambios observados en los niveles de expresión de Npr1 en una cepa silvestre y en una cepa *hal4 hal5*, especialmente en condiciones de KCl limitante, evaluamos los niveles transcripcionales de *NPR1*.

Mediante análisis *Northern blot* se comprobó que no hay diferencias significativas en la transcripción génica de *NPR1* en células WT y *hal4 hal5* (valor $p = 0.1$) (Figura 49).

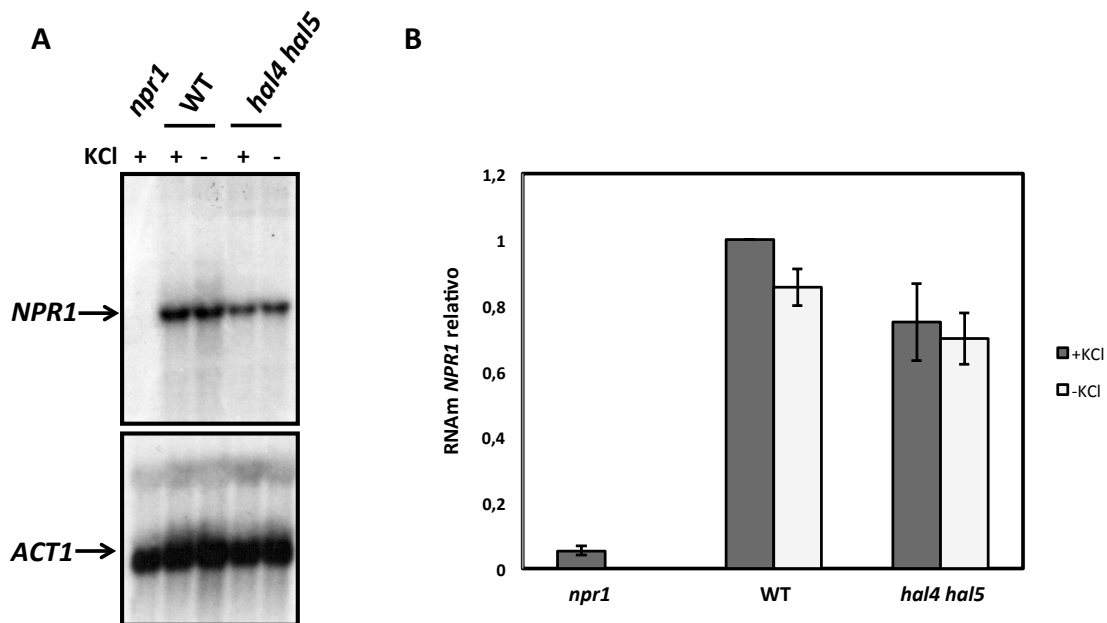


Figura 49. Análisis de la transcripción génica de *NPR1* en células de la cepa silvestre BY4741, *hal4 hal5* y *npr1* en condiciones de KCl limitante. La cepa silvestre y los mutantes indicados del fondo genético BY4741 fueron crecidos hasta fase exponencial en medio SD suplementado con KCl 0.1 M y después transferidos a un medio SD sin suplemento de KCl durante 30 minutos. (A) Análisis *Northern* de la expresión de *NPR1* y *ACT1*. El RNAm *ACT1* se muestra como control de carga. (B) Los niveles de expresión del transcrito *NPR1* mostrados en la gráfica se calcularon como el cociente entre el RNAm de *NPR1* y de *ACT1*. Se ha establecido como valor de referencia 1 la muestra WT cultivada en medio mínimo con suplemento de KCl 0.1 M. Los gráficos muestran los valores medios y la desviación estándar.

Dado que los niveles de Npr1 son menores en mutantes *hal4 hal5* y por tanto que el efecto sobre la proteína está claro, no podemos descartar completamente un componente de regulación transcripcional. No obstante, lo que queda claro es una disminución tanto de la cantidad y probablemente de la actividad de la proteína Npr1 (por el incremento en la fosforilación) en mutantes *hal4 hal5*. Esta reducción en la fosforilación/actividad de Npr1 se traduce en un incremento en la capacidad de Art1 (y probablemente Art3 y Art6) de facilitar la ubiquitinación de sus *cargos* y por tanto favorecer su acumulo en la vacuola.

4.2.3. Efecto de la sobreexpresión de *NPR1*

Si la hipótesis presentada arriba es cierta, la sobreexpresión de *NPR1* debe mejorar el fenotipo de desestabilización de los transportadores observados en un mutante *hal4 hal5*. Por tanto, analizamos el efecto de la sobreexpresión de *NPR1* en dicha cepa.

Como primer abordaje transformamos la cepa *hal4 hal5* del fondo genético BY4741 con el plásmido de sobreexpresión pWS93-*NPR1* y analizamos su fenotipo de crecimiento en medio sólido SD con y sin suplemento de KCl. Uno de los fenotipos más característicos de la cepa *hal4 hal5* es que muestra un grave defecto del crecimiento en medio mínimo y que sólo puede compensarse con un suplemento externo de KCl (0.1 M). Gracias en gran parte al análisis del transcriptoma de esta cepa *hal4 hal5*, hemos sido capaces de identificar que estos defectos en el crecimiento de esta cepa no son sólo debidos a su menor actividad del sistema Trk sino también a su menor toma de nutrientes. El crecimiento de una cepa *hal4 hal5* mejora también ligeramente al complementar múltiples auxotrofías (Perez-Valle et al., 2007).

Como se ha mencionado previamente, el mutante *hal4 hal5* tiene una tasa alta de reversión fenotípica. Por tanto, presentamos los datos de ocho clones diferentes de células *hal4 hal5* transformadas con el vector vacío y ocho clones diferentes de células *hal4 hal5* transformadas con el vector para la sobreexpresión de *NPR1* (Figura 50).

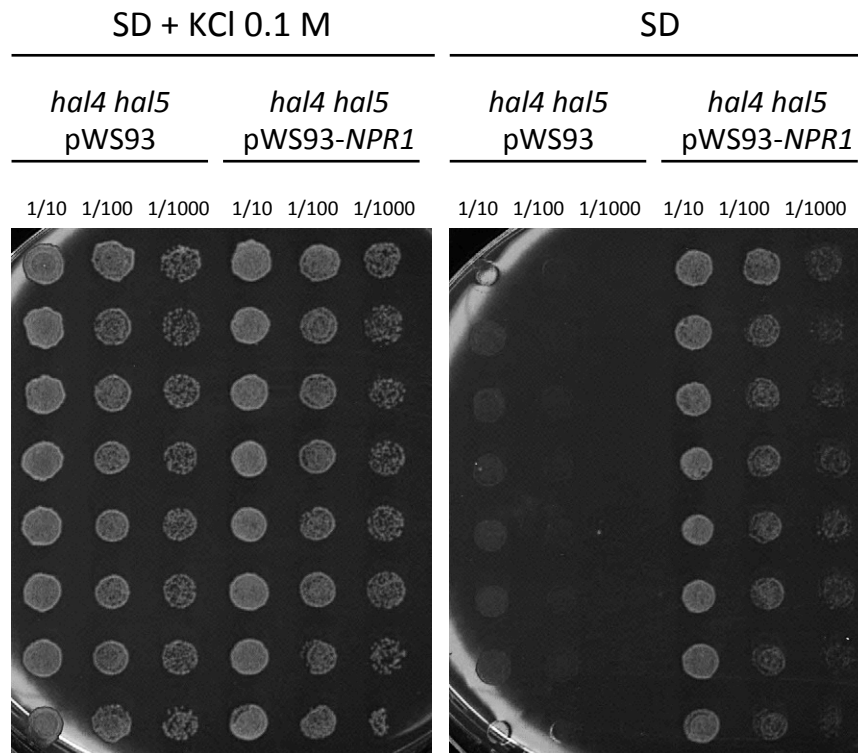


Figura 50. Ensayos de crecimiento en medio mínimo con y sin suplemento de KCl en cepas *hal4 hal5* del fondo genético BY4741 transformadas con el plásmido de sobreexpresión pWS93-NPR1 y el plásmido control pWS93. Fenotipos de crecimiento de las cepas indicadas en medio mínimo (SD) con y sin suplemento de KCl 0.1 M. Las células se crecieron hasta saturación y posteriormente se realizaron diluciones seriadas que se depositaron en placas sólidas de los medios indicados. Se tomaron imágenes del crecimiento después de 48-72 horas de incubación a 28°C. Este experimento se realizó en más de tres transformaciones independientes.

La sobreexpresión de *NPR1* rescata el crecimiento del mutante *hal4 hal5* en medio mínimo sin suplemento de KCl. En paralelo realizamos un análisis de la expresión de Npr1 mediante *Western blot* con el objetivo de confirmar que los fenotipos observados en medio sólido eran debidos a la sobreexpresión de Npr1. Podemos confirmar que los clones testados sí están expresando la quinasa Npr1 (datos no mostrados).

Una vez confirmado por *Western blot* que este fenotipo de crecimiento en medio sin suplemento de KCl mostraba una correlación con la expresión de Npr1, decidimos realizar un experimento alternativo para descartar que este fenotipo fuera debido a algún tipo de modificación genética producida por la presión de selección, de manera espontánea, en el genotipo de la cepa *hal4 hal5*. Hemos observado que el fenotipo del mutante se revierte con facilidad. Utilizamos el método de selección 5-FOA (ver Materiales y Métodos). Se analizaron 7 clones procedentes de la transformación con los plásmidos pWS93 y pWS93-NPR1 de la cepa del fondo genético BY4741 *hal4 hal5* y que había sido seleccionados con el método 5-FOA. En este medio únicamente son

capaces de crecer aquellas células auxótrofas para el uracilo, es decir, las colonias resistentes son las que habrán perdido el plásmido pWS93 o pWS93-NPR1 cuyo gen marcador es *URA3*. Se prepararon dos tipos de placas para analizar los clones que habían perdido el plásmido (-). Por un lado, placas de medio mínimo suplementado con o sin KCl y sin uracilo, donde sólo deben crecer los controles que son las cepas originalmente transformadas del mutante *hal4 hal5* con los plásmidos pWS93 y pWS93-NPR1 (+). En estas placas se muestra el fenotipo de crecimiento sin suplemento de KCl debido a la sobreexpresión de *NPR1*. Por otro lado se prepararon placas suplementadas con uracilo con y sin KCl, que confirman la pérdida del plásmido y la pérdida del fenotipo.

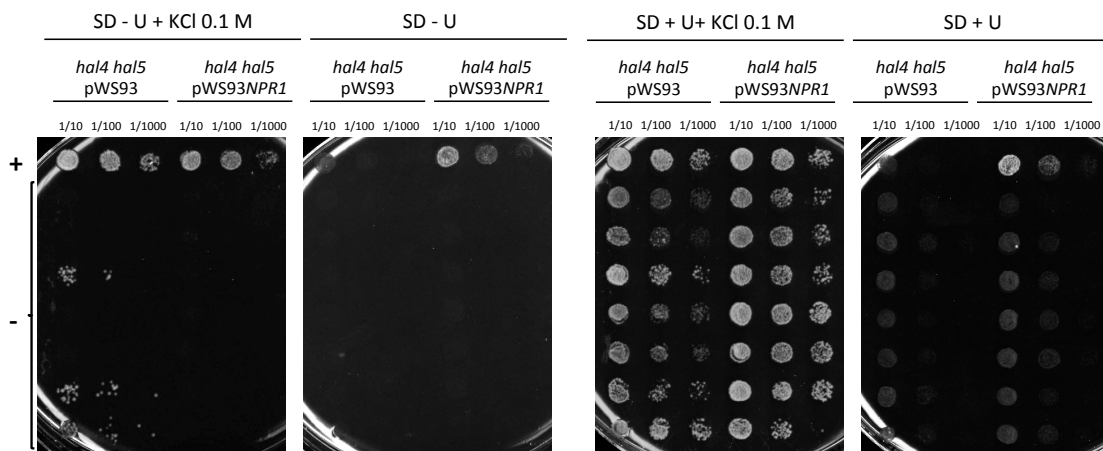


Figura 51. Evaluación de transformantes *hal4 hal5 pWS93-NPR1* seleccionados por el método de selección 5-FOA. Una vez seleccionadas las cepas con el método de selección 5-FOA analizamos 7 clones *ura3⁻* que procedían de la cepa transformada *hal4 hal5 pWS93* y 7 clones *ura3⁻* que procedían de la cepa transformada *hal4 hal5 pWS93-NPR1*, además de sus respectivos controles *ura3⁺*. Se prepararon placas de medio mínimo con y sin uracilo (U) (placas control), además de con y sin suplemento de KCl 0.1 M. Se tomaron imágenes del crecimiento después de 48-72 horas de incubación a 28°C.

Observamos en la figura 51 que las cepas que han perdido el plásmido (-), no pueden crecer en medio sin uracilo y no son capaces de crecer en medio sin suplemento de KCl, a diferencia de la cepa control *hal4 hal5 pWS93-NPR1*. Podemos por tanto afirmar que este fenotipo de crecimiento en medio mínimo sin suplemento de potasio observado en una cepa *hal4 hal5 pWS93-NPR1* es debido a la sobreexpresión de *NPR1*.

Con el fin de dar mayor firmeza a este resultado, realizamos el mismo experimento en el fondo genético W303-1A. Confirmamos que en este fondo genético la sobreexpresión de *NPR1* también rescata el fenotipo de crecimiento en medio SD sin suplemento de potasio de una cepa *hal4 hal5* (datos no mostrados).

Podemos afirmar que *NPR1* actúa como un supresor del fenotipo del mutante *hal4 hal5*, confirmando la relación entre la función de estas quinasas.

Para completar el estudio repetimos el experimento incluyendo el mutante *trk1 trk2*. Tratamos de establecer si este fenotipo depende de la expresión del sistema de potasio de alta afinidad Trk1-Trk2 mediante ensayos de crecimiento en placas con y sin suplemento de potasio (Figura 52).

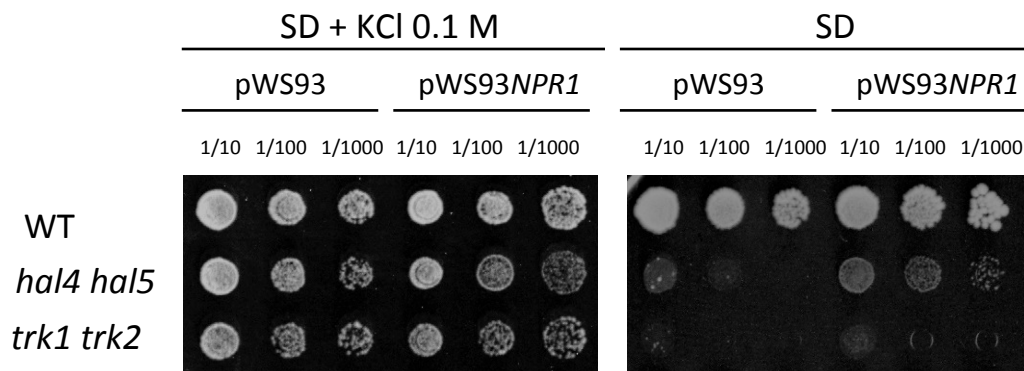


Figura 52. Ensayos de crecimiento en SD con y sin suplemento de KCl en una cepa silvestre, *hal4 hal5* y *trk1 trk2* del fondo genético BY4741 transformadas con el plásmido de sobreexpresión pWS93-NPR1 y el plásmido control pWS93. Fenotipos de crecimiento de las cepas indicadas en placas de medio mínimo con y sin suplemento de KCl 0.1 M. Las células se crecieron hasta saturación y posteriormente se realizaron diluciones seriadas que se depositaron en placas sólidas de los medios indicados. Se tomaron imágenes del crecimiento después de 48-72 horas de incubación a 28°C.

Podemos confirmar a partir de estos resultados que la sobreexpresión de *NPR1* en una cepa mutante para las quinasas Hal4 y Hal5 rescata su fenotipo de crecimiento en medio sin suplemento de potasio. Sin embargo, no es capaz de mejorar el crecimiento del mutante *trk1 trk2* sin suplemento de potasio. Este resultado podría indicar que o bien Npr1 regula directamente a los transportadores de potasio o bien mejora el fenotipo del mutante *hal4 hal5* por reducir la degradación de las permeasas de aminoácidos, como Mup1, Can1 o Dip5, entre otras.

Para investigar ambas posibilidades realizamos ensayos de crecimiento alternativos en medio sólido con estas mismas cepas. Para evaluar un posible efecto sobre la actividad del sistema de toma de potasio Trk, se ensayó la tolerancia a LiCl y el crecimiento en bajo potasio (*Translucent*). Si la sobreexpresión de *NPR1* actúa a través de un incremento en la estabilidad de Trk1, los mutantes *hal4 hal5* deben mejorar su crecimiento en presencia de LiCl y deberán crecer en medio *Translucent* sin suplemento de potasio (KCl < 15 μ M). Además, si Npr1 actúa sobre Trk1, en cepas silvestres se esperaría observar un incremento en la tolerancia a litio al sobreexpresar *NPR1*. Por otra parte, para evaluar el efecto sobre la estabilidad de las permeasas de aminoácidos de la membrana plasmática, se ensayó la tolerancia/sensibilidad al compuesto AZC (análogo tóxico de la prolina). Si la sobreexpresión de Npr1 genera la estabilización de las permeasas de aminoácidos de la membrana plasmática, esperaríamos observar que una cepa *hal4 hal5* se volviera sensible a este compuesto

como resultado de la consecuente mayor estabilidad de las permeasas.

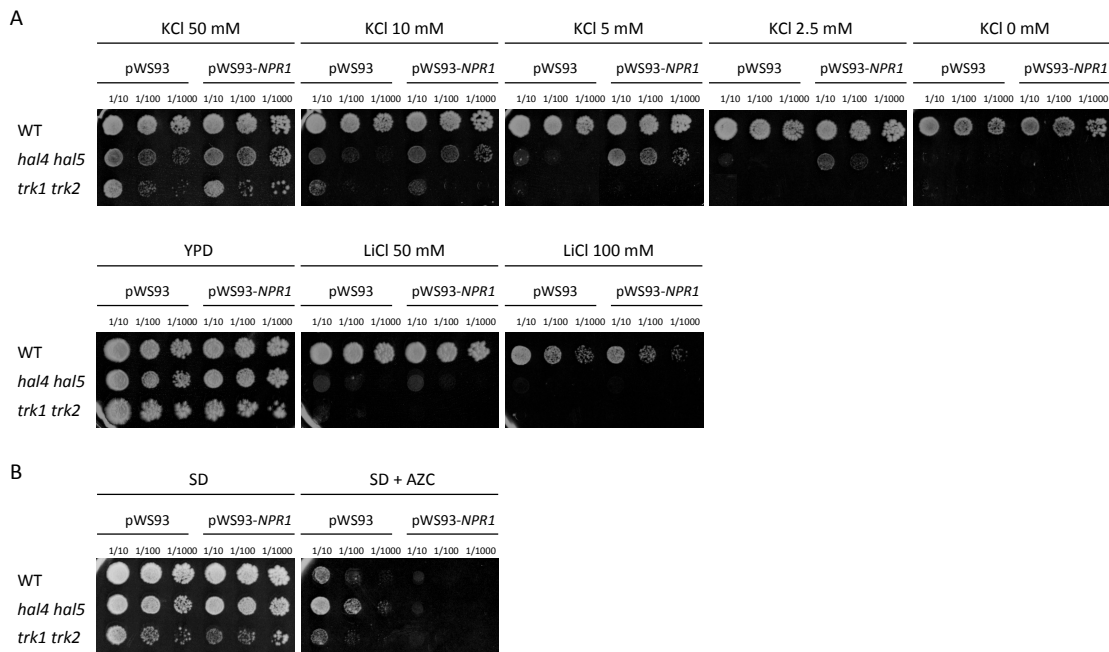


Figura 53. Ensayos de crecimiento en diferentes condiciones de las cepas silvestre, *hal4 hal5* y *trk1 trk2* del fondo genético BY4741 transformadas con el plásmido de sobreexpresión *pWS93-NPR1* y el plásmido control *pWS93*. Fenotipos de crecimiento de las cepas indicadas. (A) Se evaluó la actividad del sistema Trk medida a través de su crecimiento en medio *Translucent* con diferentes concentraciones de KCl (50, 10, 5, 2.5 y 0 mM) (panel superior) y a través de su tolerancia al catión tóxico LiCl en placas de medio YPD con LiCl 50 y 100 mM (panel inferior). (B) Se evaluó la actividad de las permeasas a través de su crecimiento en medio mínimo SD suplementado con KCl 0.1 M y el análogo tóxico de la prolina AZC a una concentración de 1.5 mM. Las células se crecieron hasta saturación y posteriormente se realizaron diluciones seriadas que se depositaron en placas sólidas de los medios indicados. Se tomaron imágenes del crecimiento después de 48-96 horas de incubación a 28°C.

Los ensayos de actividad del sistema Trk (Figura 53, panel A) indican que la sobreexpresión de *NPR1* no supone una mayor estabilidad de este sistema de toma de potasio. Las pruebas que lo sustentan son varias. En primer lugar, observamos que el crecimiento de la cepa *hal4 hal5* no es independiente del potasio ya que la cepa *hal4 hal5* no puede crecer sin suplemento de potasio en el medio *Translucent*; por debajo de una concentración de potasio 2.5 mM esta cepa presenta defectos graves en su crecimiento que la hacen inviable. Además, la sobreexpresión de *NPR1* no proporciona tolerancia a LiCl en ninguna de las cepas testadas. Estos resultados indican que aunque la sobreexpresión de *NPR1* permite el crecimiento en medio mínimo y sólo es posible en los sistemas que son capaces de expresar el sistema de toma de potasio Trk1-Trk2, este crecimiento es dependiente de potasio. Si el suplemento de potasio es inferior a 2.5 mM la cepa carente de las quinasas Hal4 y Hal5 no puede crecer.

Por otro lado, el análisis de la actividad de las permeasas indica que debe existir una mayor estabilidad de éstas en la membrana plasmática (Figura 53, panel B). Observamos que la sobreexpresión de *NPR1* en las tres cepas estudiadas produce una

mayor sensibilidad al análogo tóxico de la prolina AZC, lo cual sustenta nuestra hipótesis. El análogo tóxico de la prolina nos permite por tanto afirmar que la sobreexpresión de *NPR1* estabiliza al menos las permeasas que transportan prolina. Fenotipos similares fueron observados con el análogo tóxico de la arginina L-Canavanina (datos no mostrados). Ambos resultados dan firmeza a la hipótesis de que la sobreexpresión de *NPR1* en una cepa carente de las quinasas Hal4 y Hal5 produce el rescate de la estabilidad en la membrana plasmática de las permeasas de nutrientes.

4.2.4. Estudio del efecto de la sobreexpresión de *NPR1* en la estabilidad de los transportadores de la membrana plasmática

Con el fin de profundizar en el mecanismo molecular por el cual la sobreexpresión de *NPR1* rescata algunos fenotipos característicos relacionados con la toma de aminoácidos de la cepa mutante *hal4 hal5*, analizamos la localización subcelular de la permeasa de metionina Mup1. Tratamos de demostrar que la mayor expresión de Npr1 posee un efecto sobre la estabilización en la membrana plasmática de las permeasas que transportan aminoácidos en esta cepa mutante para las quinasas Hal4 y Hal5. También analizamos el transportador Trk1 con el fin de confirmar que este efecto de la sobreexpresión de Npr1 es específico para los defectos de la cepa *hal4 hal5* relacionados con la toma de aminoácidos y no con sus defectos en la toma de potasio, como ya han sugerido los ensayos de crecimiento en medio sólido.

Para abordar esta hipótesis, en primer lugar se transformaron células del doble mutante *hal4 hal5* del fondo genético BY4741 con el plásmido centromérico pRS416-*MUP1-GFP* y con el plásmido para la sobreexpresión de *NPR1* (pWS93-*NPR1*) o su plásmido control pWS93. Puesto que trabajamos con la cepa del fondo genético BY4741, que es *met15*, y puesto que la permeasa de Mup1 se internaliza en presencia de metionina en el medio de cultivo, también transformamos las cepas con el plásmido para la complementación del gen de metionina pRS411 (*MET15*). Ambas cepas fueron crecidas hasta fase exponencial para su visualización por microscopía confocal en condiciones de con y sin suplemento de KCl 0.1 M (Figura 54). Estos estudios de localización subcelular se confirmaron por análisis *Western blot* donde se analizó la fracción insoluble (Figura 55).

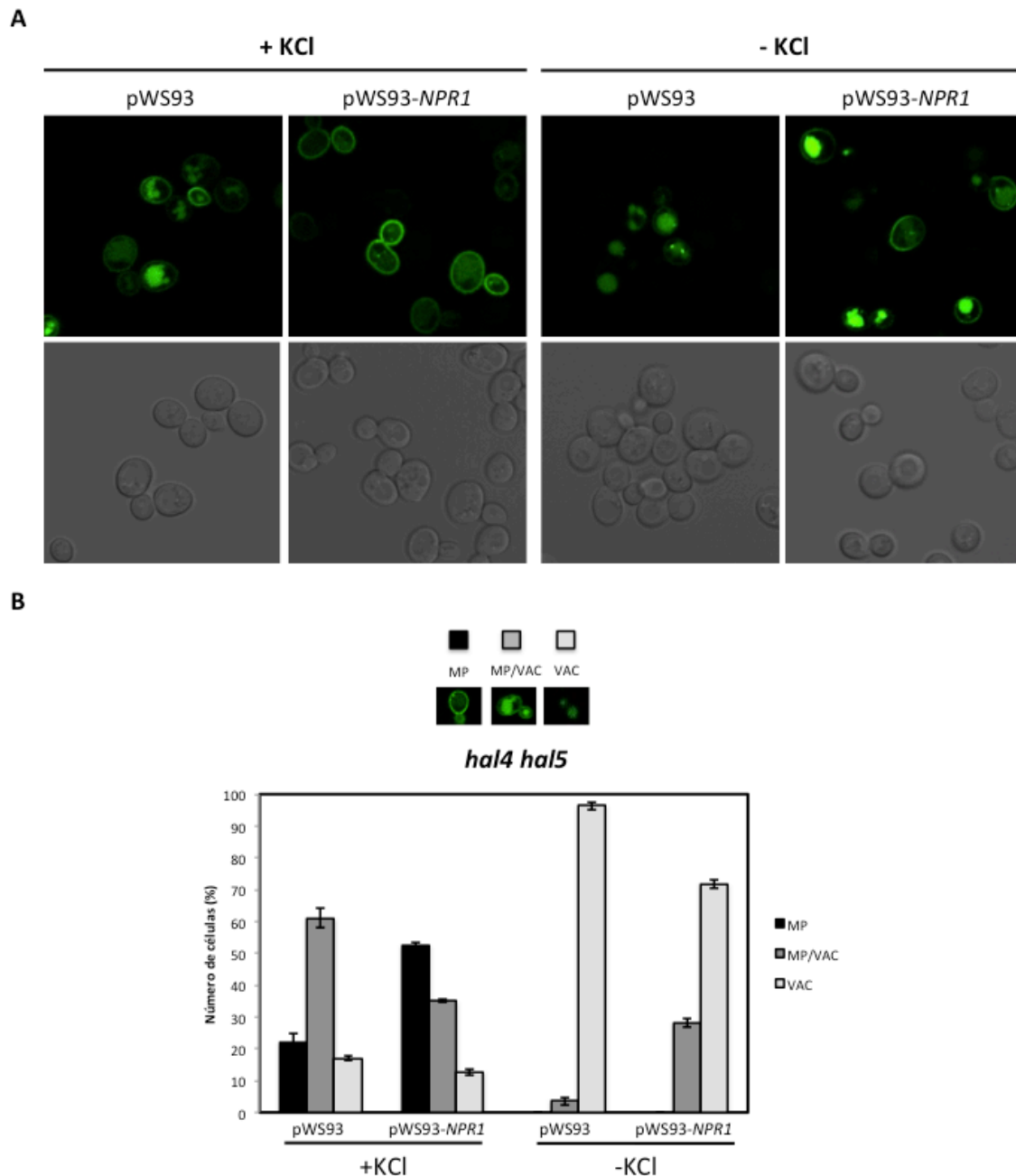


Figura 54. Efecto de la sobreexpresión de *NPR1* en la localización subcelular de la permeasa de metionina Mup1-GFP en una cepa *hal4 hal5* en condiciones de KCl limitante. (A) La cepa *hal4 hal5* fue transformada con un plásmido que expresa la proteína de fusión Mup1-GFP, el plásmido pRS411 y el plásmido multicopia pWS93-NPR1 o su correspondiente vector vacío pWS93, crecidas hasta fase logarítmica en medio mínimo suplementado con KCl 0.1 M y posteriormente lavadas y transferidas a medio mínimo sin suplemento de potasio durante 120 minutos y analizadas por microscopía confocal. Se muestran las imágenes más representativas de cada situación. (B) Valores de cuantificación del porcentaje de células de las cepas del panel A que presentan Mup1-GFP exclusivamente en la membrana plasmática (MP), en la membrana plasmática y en la vacuola (MP/VAC) y exclusivamente en la vacuola (VAC) en las condiciones del panel A. Se analizaron más de 50 células procedentes de tres experimentos independientes.

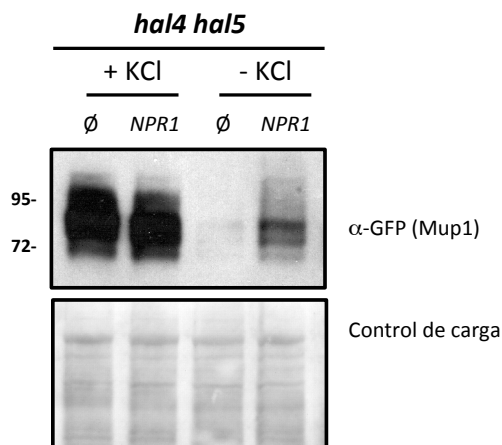


Figura 55. Análisis *Western blot* del efecto de la sobreexpresión de *NPR1* en la localización subcelular de la proteína Mup1 en una cepa *hal4 hal5* en condiciones de KCl limitante. Las proteínas de la fracción insoluble se aislaron en las mismas cepas tratadas como se describe en la figura 54. La nomenclatura de los plásmidos fue: pWS93 (\emptyset) o pWS93-*NPR1* (*NPR1*). El anticuerpo anti-GFP reconoce la proteína de fusión Mup1-GFP. Se muestra la tinción con *Direct Blue* como control de carga de proteínas. Los marcadores de peso molecular se muestran a la izquierda de la figura (kDa). Este experimento se realizó en tres clones independientes.

Podemos afirmar a partir de los resultados de microscopia confocal y *Western blot* (figuras 54 y 55) que en cepas carentes de las quinasas Hal4 y Hal5, la sobreexpresión de *NPR1* permite una mayor estabilidad de Mup1 en la membrana plasmática. En condiciones de suplemento de potasio en el medio, el porcentaje de células con Mup1 en la membrana plasmática así como la expresión, es la misma en ambas cepas, sin embargo la distribución celular de Mup1 es diferente; un 30% más de células exhiben un contenido de Mup1 exclusivamente en la MP (con esta sobreexpresión). Por otro lado, en condiciones de potasio limitante (-KCl), la cantidad de proteína Mup1 en la fracción insoluble es mayor en la cepa *hal4 hal5* pWS93-*NPR1*. Cabe destacar que la mayor expresión de *NPR1* no elimina la degradación vacuolar de Mup1 en una cepa *hal4 hal5*. En condiciones de suplemento de KCl todavía observamos GFP vacuolar (aunque en menor cantidad). En condiciones limitantes de KCl Mup1 se internaliza aunque de forma menos acusada. Seguimos observando Mup1 en la membrana plasmática tras 120 minutos de crecimiento en medio sin suplemento de KCl, a diferencia con las cepas que no sobreexpresan *NPR1*, cuyo contenido de Mup1 en estas condiciones es prácticamente vacuolar.

Para demostrar que el efecto de la mayor expresión de Npr1 es específico en la estabilidad de las permeasas y no afecta a la toma de potasio, analizamos la estabilidad del transportador Trk1 en una cepa *hal4 hal5* que sobreexpresa *NPR1*. En este caso transformamos la cepa *hal4 hal5* con un plásmido centromérico con la proteínas de fusión Trk1-GFP y los plásmidos pWS93-*NPR1* o su plásmido control

pWS93. Analizamos la acumulación de Trk1 por *Western blot* en estas cepas tratadas con y sin suplemento de potasio. Los resultados se muestran en la figura 56.

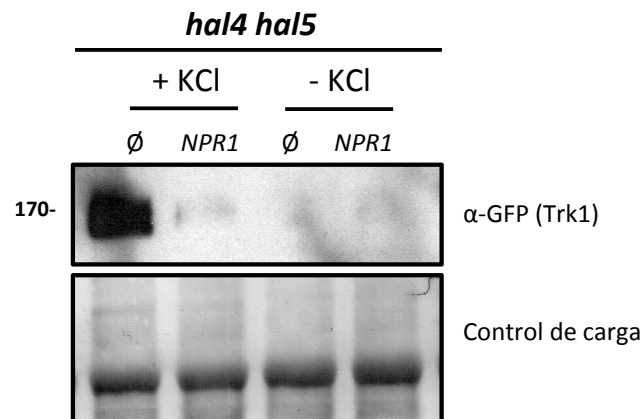


Figura 56. Análisis *Western blot* del efecto de la sobreexpresión de *NPR1* en la acumulación de la proteína Trk1 en una cepa *hal4 hal5* en condiciones de KCl limitante. Las proteínas de la fracción insoluble se aislaron en la cepa *hal4 hal5* del fondo genético BY4741 expresando un plásmido con la proteína de fusión Trk1-GFP y los plásmidos pWS93 (∅) o pWS93-*NPR1* (*NPR1*), crecidas hasta fase logarítmica en medio mínimo suplementado con KCl 0.1 M y posteriormente lavadas y transferidas a medio mínimo sin suplemento de KCl durante 120 minutos. El anticuerpo anti-GFP reconoce la fusión Trk1-GFP. Se muestra la tinción con *Direct Blue* como control de carga de proteínas. Los marcadores de peso molecular se muestran a la izquierda de la figura (kDa). Este experimento se realizó en tres clones independientes.

Contrariamente a lo que habíamos postulado en nuestra hipótesis que establecía que los niveles de Trk1 en la membrana plasmática no debían variar entre ambas cepas, observamos que *Npr1* sí posee un efecto sobre la estabilidad de Trk1 en la membrana plasmática. Las cepas que sobreexpresan *NPR1* poseen una menor cantidad de Trk1 en la fracción insoluble. Cabe destacar que estos son experimentos preliminares y que se necesita una mayor investigación para caracterizar este fenotipo. Sin embargo, los resultados son muy interesantes porque encajan con otros resultados obtenidos en este trabajo que sugieren un posible papel de *Art1* en el tráfico a la membrana plasmática de Trk1, un papel que ya ha sido observado para otros miembros de esta familia de adaptadores.

4.3. Análisis de la capacidad supresora de componentes de la ruta TORC1 en mutantes *hal4 hal5*

Hasta este punto del Capítulo 2 nuestros resultados apuntan en la dirección de una posible implicación de las quinasas *Hal4* y *Hal5* en la ruta de señalización TOR. Una posible hipótesis consiste en que estas quinasas puedan ejercer un papel específico en el control de *Npr1*. Hemos observado que su ausencia favorece que *Npr1* permanezca fosforilado, especialmente en condiciones de ayuno de potasio. Ello podría sugerir un efecto específico de *Hal4* y *Hal5* en la regulación de *Npr1*. Este papel podría ser o bien directo, aunque no parece probable puesto que *Npr1* permanece fosforilado ante la

ausencia de estas quinasas, o bien a través del control de alguna fosfatasa como por ejemplo el complejo de fosfatasas Tap42-Sit4, que es un complejo de proteína fosfatasa que regula Npr1 (Schmidt et al., 1998; Crespo and Hall, 2002; Merhi and Andre, 2012). Otra alternativa es que la ausencia de las quinasas posea un efecto en la ruta TORC1 aguas arriba de la proteína quinasa Npr1.

Con el fin de abordar esta cuestión, decidimos analizar el fenotipo de las cepas silvestre y *hal4 hal5* transformadas con una batería de plásmidos centroméricos que portan diferentes genes de la ruta de señalización del complejo TORC1 aguas arriba de Npr1. Como controles empleamos también un plásmido centromérico y otro multicopia del gen *NPR1*; hemos observado que este último rescata el fenotipo de crecimiento en medio sólido SD de una cepa *hal4 hal5* en condiciones de KCl limitante (Figura 52).

Los plásmidos empleados en este experimento fueron los que se describen a continuación: el vector centromérico vacío (YCp), el plásmido que porta una versión silvestre de la proteína Tor1 (YCp-*TOR1_{WT}*), otro plásmido con una versión hiperactiva (e insensible a la activación aguas arriba) de esta proteína Tor1 que porta una mutación en el dominio quinasa (Tor1_{L2134M}) (YCp-*TOR1_{LM}*) (Kingsbury et al., 2014), el plásmido centromérico con la proteína Sch9 (YCp-*SCH9*) y las versiones inactivas *pSCH9_{K441A}* y *pSCH9_{D556T}* (Pascual-Ahuir and Proft, 2007).

Una vez se transformaron las cepa silvestre y *hal4 hal5* con esta batería de plásmidos se realizaron ensayos de crecimiento en medio mínimo con y sin suplemento de KCl, en medio mínimo con AZC y en medio *Translucent* con diferentes concentraciones de KCl, que se consideran limitantes (Kahm et al., 2012) (Figura 57).

El fenotipo observado más significativo fue el rescate del crecimiento en medio SD sin suplemento de KCl (y en AZC y *Translucent*) de la cepa *hal4 hal5* por la sobreexpresión de *NPR1*, como ya habíamos observado anteriormente. Sin embargo, como se observa en la figura 57, ninguno de los plásmidos empleados con los genes de la ruta TORC1 aguas arriba de Npr1 rescata el fenotipo de la cepa *hal4 hal5* en ninguno de los medios probados. En el caso de la cepa silvestre, ninguna de las transformaciones exhibe diferencias significativas con la cepa silvestre transformada con el vector vacío. No se observan fenotipos en las cepas que expresan las distintas versiones de *SCH9*, *TOR1* ni *NPR1*.

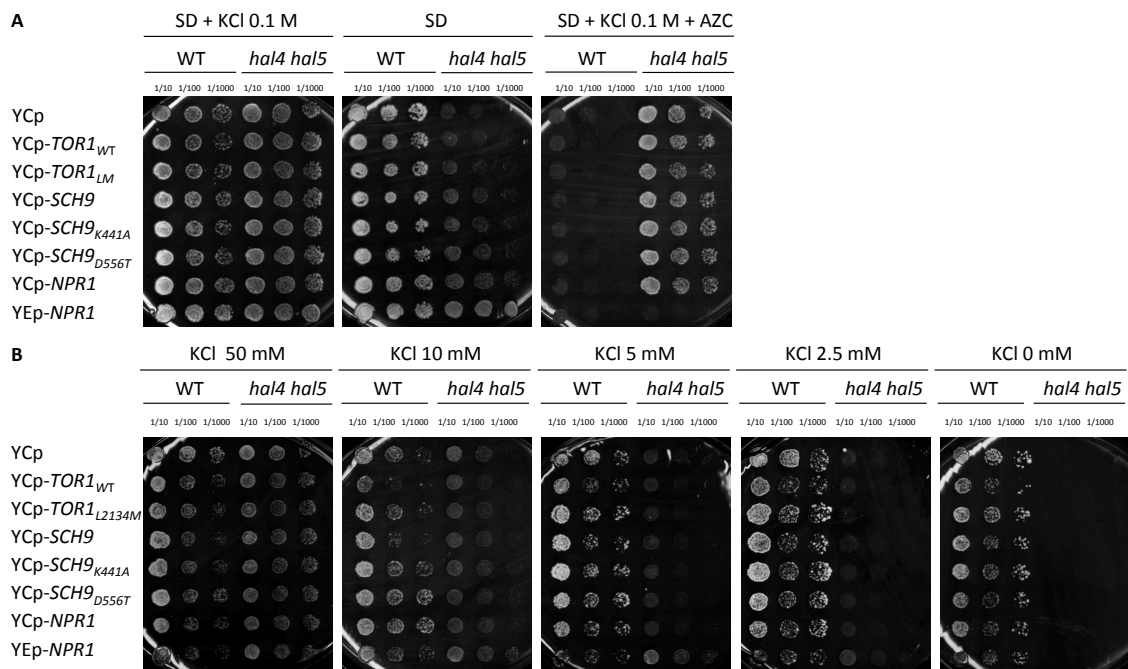


Figura 57. Ensayos de crecimiento de una cepa silvestre y *hal4 hal5* transformadas con los plásmidos que portan la versión silvestre e hiperactiva de *TOR1* (YCp-*TOR1*_{WT} y YCp-*TOR1*_{LM}), la versión silvestre e inactivas de *SCH9* (YCp-*SCH9*, YCp-*SCH9*_{K441A} y YCp-*SCH9*_{D556T}) y la versión silvestre de *NPR1* en un vector centromérico (YCp-*NPR1*) y multicopia (YEp-*NPR1*), en un fondo genético BY4741. Fenotipos de crecimiento de células de *S. cerevisiae* de una cepa WT (BY4741) y una cepa mutante *hal4 hal5* que portan los plásmidos indicados en placas de SD con y sin suplemento de KCl, de SD con suplemento de KCl 0.1 M y el análogo tóxico de la prolina AZC a una concentración 1.5 mM (panel A) y de *Translucent* con diferentes concentraciones de KCl (50, 10, 5, 2.5 y 0 mM de KCl) (panel B). Las células se crecieron hasta saturación en medio mínimo suplementado con KCl 0.1 M. Posteriormente se realizaron diluciones seriadas y se depositaron en placas sólidas de los medios indicados. Se tomaron imágenes después de 48-96 horas de incubación a 28°C. Se analizaron más de tres clones independientes.

Estos resultados indican que el rescate del crecimiento del mutante *hal4 hal5* es específico de *NPR1* y que dicho efecto es dependiente de la concentración de KCl, como ya habíamos observado. Es decir, es la sobreexpresión de la quinasa Npr1 y no la alteración de la actividad de Sch9 o de Tor1 la que rescata el crecimiento en condiciones limitantes de KCl en una cepa *hal4 hal5*.

Capítulo 3

**ESTUDIO DE LA POSIBLE CONEXION ENTRE
LA HOMEOSTASIS DE POTASIO Y LA RUTA
DE SEÑALIZACION TOR**

Los resultados obtenidos hasta ahora indican que la concentración de K^+ interno podría constituir una señal de activación del complejo TORC1. Concentraciones limitantes de KCl parecen inducir un estado de hiperfosforilación del efector de la ruta TORC1, la quinasa Npr1.

El objetivo de este Capítulo es tratar de definir que efectores aguas abajo de TOR, además de la quinasa Npr1, y por tanto qué rutas de señalización gobernadas por TORC1 y TORC2 se ven afectadas por los niveles intracelulares de potasio bajos. También analizamos la posibilidad de una relación funcional entre los componentes de los complejos TORC1 y TORC2 y la homeostasis de iones.

1. Caracterización del K^+ como posible señal de la ruta TOR

Algunos de los procesos que coordina TORC1, con el fin de controlar el crecimiento celular, son: la endocitosis mediada por ubiquitina, la transcripción inducida por estrés, la autofagia o la síntesis de proteínas. Esta ruta de señalización funciona a través de proteínas específicas como la quinasa Npr1, el factor de transcripción Gln3, la quinasa Atg1 y la quinasa Sch9, respectivamente. El estudio de estas proteínas constituye un buen indicador de una posible alteración de las rutas de señalización mediadas por TORC1. El control de otros procesos como la polarización del citoesqueleto de actina y la síntesis de esfingolípidos son controlados por TORC2 a través de sustratos como las quinasas Ypk1 y Ypk2.

En este apartado vamos a estudiar algunas de estas proteínas implicadas en distintas ramas de la ruta de señalización mediada por TORC1 y TORC2 en condiciones de ayuno de potasio, con el fin de determinar que componentes de la ruta TOR, además de Npr1, responden a concentraciones limitantes de KCl.

1.1. Estudio de la estabilidad de la permeasa Can1 en la membrana plasmática en condiciones de ayuno de KCl

Uno de los procesos regulados por TORC1 es la regulación de las permeasas de la membrana plasmática, lo que permite a las células, ante determinadas señales, remodelar la composición de la membrana con el fin de tomar sólo los aminoácidos necesarios (Van Belle and Andre, 2001; Loewith and Hall, 2011). El complejo TOR1 parece regular estos eventos de clasificación a través de su efector Npr1 (vía el complejo Tap42-fosfatasa) (Schmidt et al., 1998; Beck et al., 1999; De Craene et al., 2001; Jacinto et al., 2001; Soetens et al., 2001; Breitskreutz et al., 2010).

En este trabajo de Tesis hemos observado que la quinasa Npr1 permanece hiperfosforilada en condiciones de ayuno de potasio. Decidimos analizar si la hiperfosforilación observada también conduce a una remodelación de los transportadores de la membrana plasmática.

La contribución de las quinasas Hal4 y Hal5 en la estabilización de las permeasas de la membrana plasmática en condiciones de bajo potasio interno es primordial. Mutantes *trk1 trk2* presentan un fenotipo similar pero no idéntico al de mutantes *hal4 hal5* (en cuanto a estabilidad de transportadores en la membrana plasmática) (Perez-Valle et al., 2007). Planteamos la hipótesis de que las condiciones de ayuno de potasio deben ser, en parte, una señal de regulación de la estabilidad de permeasas en la membrana plasmática. Sin embargo, los experimentos de Perez-Valle, al estar realizados en medio mínimo (KCl no limitante), no permiten discernir si dicho efecto es debido completamente a la ausencia de las quinasas en sí o si existe una contribución del potasio .

Si la hipótesis presentada es cierta, esperamos observar un acumulo vacuolar de Can1-GFP en condiciones de ayuno de potasio. Analizamos por microscopía confocal la localización subcelular de la proteína de fusión Can1-GFP en condiciones de ayuno de KCl (*Translucent*) (Figura 58). Este experimento fue también confirmado por análisis *Western blot*, donde se analizó la fracción soluble e insoluble de los extractos proteicos (Figura 59).

En células silvestres cultivadas en medio *Translucent* con suplemento de KCl, Can1-GFP se localiza mayoritariamente en la membrana plasmática (Figuras 58 y 59). Cabe destacar que parte de esta proteína también se observa en la vacuola. Esta distribución no se observa en medio mínimo estándar donde Can1-GFP se localiza exclusivamente en la membrana plasmática (ver por ejemplo Figura 38). Aunque la explicación de esta diferencia no está clara, dicho efecto podría ser debido a las condiciones limitantes de nutrientes del medio mínimo *Translucent* que son independientes de la cantidad de potasio. Por otro lado, podemos observar que condiciones prolongadas de ayuno de potasio no implican cambios importantes en la cantidad ni en la distribución de Can1-GFP. Cabe destacar que en estas condiciones, la concentración interna de potasio decrece considerablemente (400 nmol mg⁻¹ células a tiempo 0 hasta 150 nmol mg⁻¹ células a 180 minutos (Navarrete et al., 2010)). En el análisis *Western blot* se aprecian alteraciones en la movilidad electroforética entre las diferentes fracciones (Figura 59); el tamaño de Can1 en la fracción soluble es superior al de la fracción insoluble, lo cual podría sugerir una posible ubiquitinación.

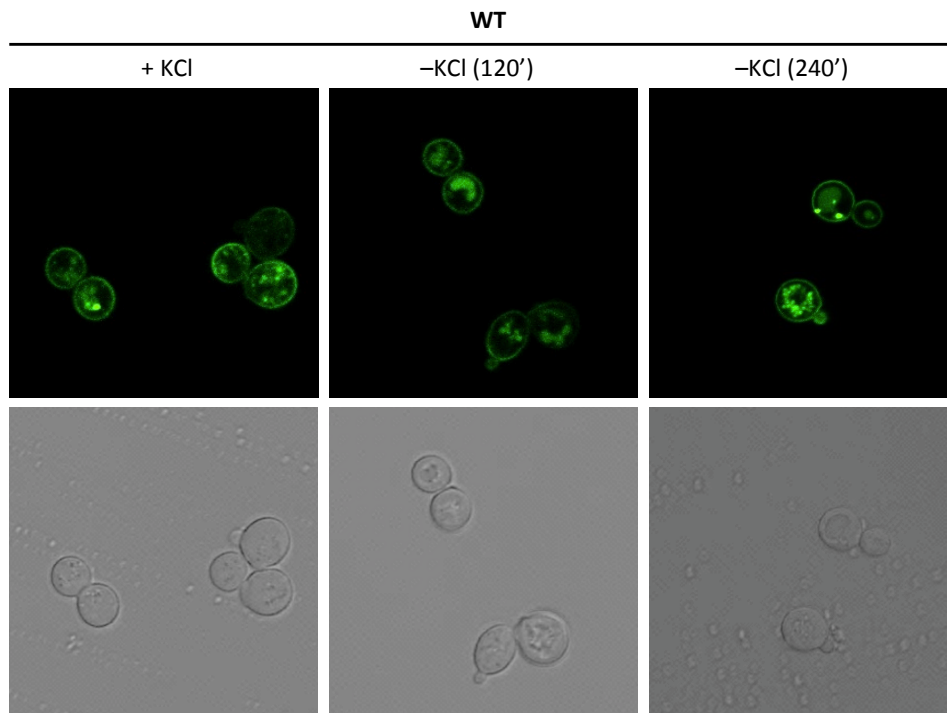


Figura 58. Localización subcelular de la permeasa de arginina Can1-GFP en la cepa silvestre en condiciones de ayuno de KCl. La cepa silvestre del fondo genético BY4741 fue transformada con un plásmido que expresa la proteína de fusión Can1-GFP. Las células fueron cultivadas hasta fase logarítmica en medio *Translucent* suplementado con KCl 50 mM y posteriormente en medio *Translucent* sin suplemento de KCl durante 120 y 240 minutos y analizadas por microscopía confocal. Se muestran las imágenes más representativas de cada situación. Este experimento se realizó en tres clones independientes.

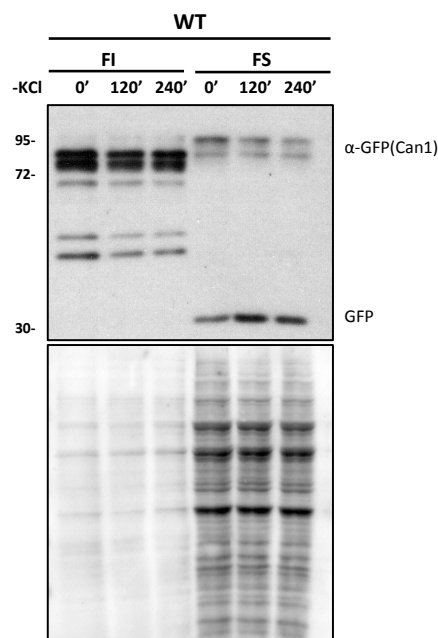


Figura 59. Análisis *Western blot* de la proteína Can1 en condiciones de ayuno de KCl. Las proteínas de la fracción insoluble (FI) y soluble (FS) se aislaron en la cepa silvestre expresando un plásmido con la proteína de fusión Can1-GFP. Tratadas como se ha descrito en la figura 58. El anticuerpo anti-GFP reconoce la fusión Can1-GFP. Se muestra la tinción con *Direct Blue* como control de carga de proteínas. Los marcadores de peso molecular se muestran a la izquierda de la figura (kDa).

Estos datos sugieren que el efecto de la desestabilización de las permeasas observado en una cepa *hal4 hal5* en condiciones limitantes de KCl es fundamentalmente debido a la ausencia de las quinasas. La señal de bajo potasio no constituye una forma de control por TORC1 de la estabilidad de las permeasas de la membrana como lo hacen otros compuestos como la cicloheximida (activador de la ruta TORC1) (MacGurn et al., 2011).

1.2. Estudio de la proteína marcadora del proceso de autofagia Atg8 en condiciones de ayuno de KCl

La autofagia, es una ruta de degradación proteica muy conservada y crucial en la respuesta a ayuno de células eucariotas regulada también por TORC1 (Noda and Ohsumi, 1998; Klionsky and Emr, 2000; Kamada et al., 2010). Específicamente, la macroautofagia implica la formación de vesículas de doble membrana conocidas como autofagosomas, que secuestran porciones del citosol. Éstas culminan fusionándose a la vacuola y liberando su contenido. Este proceso se clasifica en cuatro etapas principales: inducción de la vesícula, nucleación de la vesícula, expansión y culminación de la vesícula y formación del autolisosoma. En levadura, han sido identificadas 31 proteínas localizadas muy cerca de la membrana vacuolar relacionadas con la autofagia (Atg) (Mizushima, 2007). De éstas, 18 proteínas Atg (Atg1-10, Atg12-14, Atg16-18, Atg 29 y Atg31) están relacionadas con la formación del autofagosoma. Aunque la función precisa de estas proteínas todavía no ha sido caracterizada en profundidad, sí se han descrito algunas funciones para algunas de ellas, como se describe a continuación. La fase de **inducción** viene gobernada por la quinasa TORC1 quien inhibe la autofagia a través de la fosforilación de la proteína Atg13, que previene su asociación con la Serina/Treonina quinasa Atg1 (Kamada et al., 2010). En la **nucleación** de la vesícula, que consiste en el paso inicial donde se reclutan las proteínas y lípidos para la formación del autofagosoma, se requiere el reclutamiento de las proteínas Atg en el PAS (estructura pre-autofagosomal) y el complejo fosfatidilinositol-3-quinasa (PtdIns3K). La formación del autofagosoma es un proceso de formación *de novo* en el cual membranas que emergen en el PAS por flujo directo, procedentes o bien del ER o bien de vesículas, sellan y encierran los *cargos* citosólicos. En este proceso participa la proteína de tipo ubiquitina Atg8 (Chen and Klionsky, 2011).

La proteína Atg8 es clave para la maduración del autofagosoma (Xie and Klionsky, 2007). En condiciones que inducen la autofagia, Atg8 (previamente libre en el citoplasma) se asocia a membranas tras acoplarse al lípido fosfatidiletanolamina (PE). Este proceso de modificación post-traducciona llamado lipidación se lleva a cabo por el sistema de conjugación de Atg8 que comprende a la proteasa Atg4 así como a las proteínas Atg7 y Atg3 (Geng and Klionsky, 2008). La modificación lipídica se inicia por un corte por Atg4 en un residuo de arginina (Arg 117) de la proteína Atg8 (necesario

para su maduración) que expone un residuo de lisina que será covalentemente conjugado al PE (Atg8-PE) permitiendo la asociación a membranas. El reclutamiento de Atg8 y otras proteínas implicadas en la autofagia se cree que desencadena la **expansión** de la vesícula de manera coordinada generando la fuerza que dirige la curvatura de la membrana. Una fusión N-terminal de GFP a Atg8 se puede emplear para evaluar la autofagia por *Western blot*, puesto que la aparición de GFP libre es indicativo de un flujo autofágico (Nair et al., 2011; Mizushima et al., 2001). Con el fin de abordar si las condiciones de KCl limitante inducen un proceso de autofagia empleamos este marcador *GFP-ATG8*.

Para este ensayo transformamos células de la cepa silvestre del fondo genético W303-1A, previamente modificadas para complementar las rutas de biosíntesis de aminoácidos, con el plásmido pRS416-GFP-ATG8. Empleamos esta cepa sin auxotrofías para evitar el posible efecto de un ayuno de aminoácidos que podría enmascarar el efecto del potasio. Estas células fueron sometidas a un ayuno de potasio prolongado en medio *Translucent* para su posterior análisis *Western blot*. También se tomaron muestras de estas cepas cultivada en medio mínimo sin suplemento de potasio como control interno. Como control de autofagia se trataron estas mismas células con rapamicina. Los resultados se muestran en la figura 60.

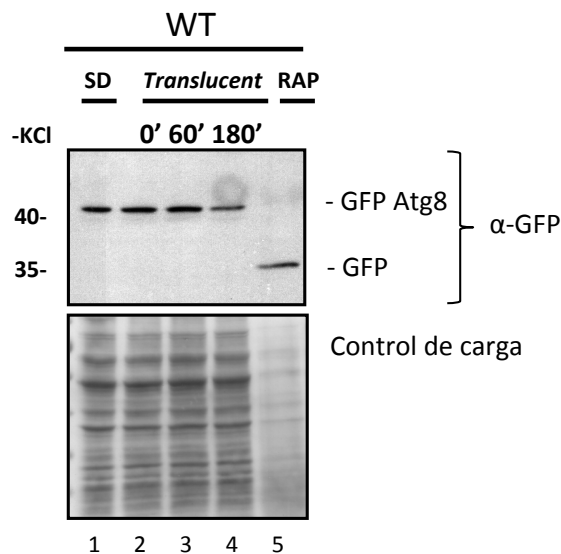


Figura 60. Análisis *Western blot* del flujo autofágico en condiciones de ayuno de KCl empleando la proteína GFP-Atg8. Las células silvestre W303-1A fueron cultivadas hasta fase logarítmica en medio *Translucent* suplementado con KCl 10 mM y adenina. Posteriormente estas células fueron lavadas y transferidas a medio *Translucent* sin suplemento de KCl. Se tomaron muestras a tiempo 0, 60 y 180 minutos (carril 2, 3 y 4, respectivamente). También se cultivó esta cepa en medio SD sin suplemento de KCl (carril 1). Como control de autofagia se utilizó el tratamiento con rapamicina (RAP) a una concentración final de 200 ng/ml, durante 15 minutos (carril 5). El anticuerpo anti-GFP reconoce la proteína de fusión GFP-Atg8 y el GFP libre. Se ha mostrado la tinción con *Direct Blue* como control de carga de proteínas. Los marcadores de peso molecular se muestran a la izquierda de la figura (kDa). Este experimento fue realizado en tres clones independientes.

En condiciones de ayuno de potasio no se observa GFP libre (indicador de flujo autofágico). También se evaluó el flujo autofágico en medio mínimo en los mutantes *hal4 hal5* y *trk1 trk2*. Los resultados fueron negativos (datos no mostrados).

Todos estos resultados indican que las condiciones de ayuno de potasio no inducen el proceso de autofagia.

1.3. Estudio de las quinasas Sch9 y Ypk1, sustratos directos de los complejos TORC1 y TORC2, en condiciones de ayuno de potasio

La proteína quinasa Sch9 es un sustrato directo de TORC1 requerido para regular la biogénesis de ribosomas, el inicio de la traducción y la entrada en la fase G₀. Sin embargo, no es requerido para la expresión de genes dependientes de Gln3 (Urban et al., 2007). Por otro lado, el sustrato directo de TORC2, la quinasa Ypk1, es requerida en la regulación de la biosíntesis de esfingolípidos (Roelants et al., 2011; Berchtold et al., 2012;).

En este apartado se describe el análisis bioquímico de las proteínas Sch9 y Ypk1 en condiciones de ayuno de potasio. Estos experimentos se muestran en el mismo apartado por realizarse en paralelo e incluyen a las cepas *hal4 hal5* y *trk1 tr2* como controles de bajos niveles intracelulares de potasio.

Para abordar la posibilidad de que las proteínas Sch9 y Ypk1 respondan a condiciones de ayuno de potasio, se cultivaron células de la cepa silvestre y de las cepas mutantes *hal4 hal5* y *trk1 trk2* en medio *Translucent* suplementado con KCl 50 mM (no limitante). Posteriormente se realizaron los tratamientos de ayuno de potasio en estas cepas y se analizó por *Western blot* la fosforilación relativa de Sch9 y Ypk1. Además de este tratamiento de ayuno de KCl, las células de la cepa silvestre fueron tratadas con cicloheximida y rapamicina, como controles de hiperfosforilación y desfosforilación, respectivamente, del sustrato de TORC1, Sch9. Cabe destacar que el complejo TORC2, y específicamente su sustrato Ypk1, es insensible a dichos compuestos.

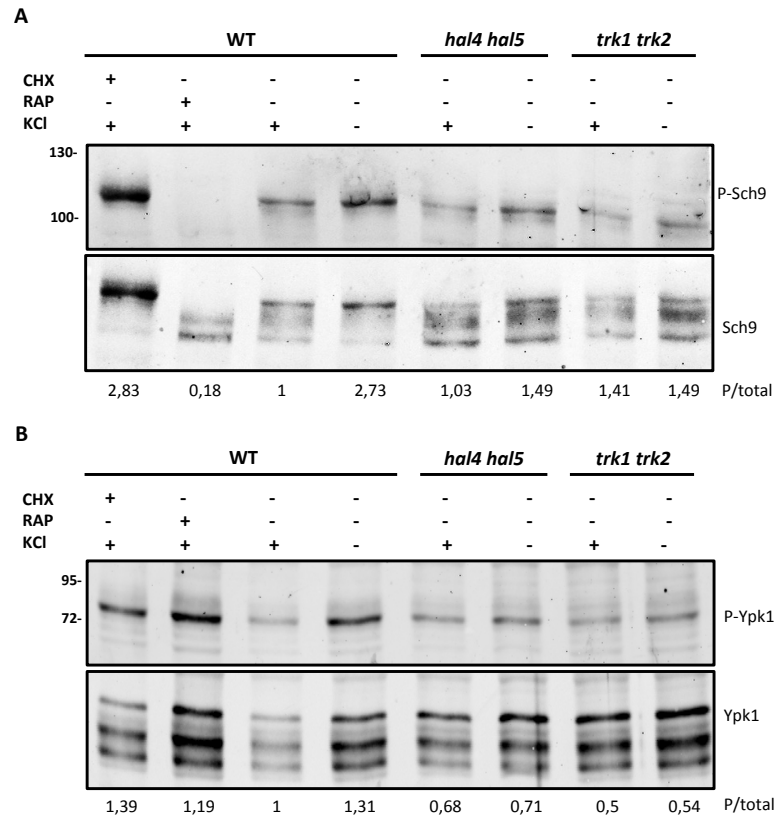


Figura 61. Análisis *Western blot* de la fosforilación de las quinasas Sch9 y Ypk1 en la cepa silvestre y las cepas mutantes *hal4 hal5* y *trk1 trk2* en condiciones de ayuno de KCl. Las células silvestre W303-1A, *hal4 hal5* y *trk1 trk2* fueron crecidas hasta fase logarítmica en medio *Translucent* suplementado con KCl 50 mM y con los aminoácidos de las auxotrofías de este fondo genético. Posteriormente, las células fueron transferidas a medio *Translucent* fresco suplementado con KCl 50 mM o a medio *Translucent* sin suplemento de KCl, durante 30 minutos. También se realizaron los siguientes controles (ver Materiales y Métodos): células tratadas con rapamicina (RAP) y células tratadas con cicloheximida (CHX). Se tomaron muestras para su análisis *Western blot*. Tras ser extraídas por el método del TCA, las proteínas fueron separadas en geles de SDS-PAGE y se analizó el cambio en la fosforilación de las quinasas Sch9 (A) y Ypk1(B), mediante anticuerpos fosfoespecíficos. El anticuerpo anti-Sch9_p reconoce la forma fosforilada del aminoácido S758 de la proteína Sch9 (P-Sch9) y el anticuerpo Sch9_{TOTAL} reconoce la proteína Sch9 independientemente de su modificación post-traducciona (Sch9). El anticuerpo Ypk1_p reconoce la forma fosforilada del aminoácido T662 de Ypk1 (P-Ypk1), mientras que el anticuerpo Ypk1_{TOTAL} reconoce la proteína Ypk1 independientemente de su modificación post-traducciona (Ypk1). Se han cuantificado los valores de la forma fosforilada con respecto a la total de las proteínas Sch9 y Ypk1 estableciendo como valor de referencia la muestra WT cultivada en medio *Translucent* con suplemento de KCl 50 mM y cuyo valor se ha fijado en 1. Este experimento fue realizado en más de tres clones independientes. Los marcadores de peso molecular se muestran a la izquierda de la figura (kDa).

En la figura 61, panel A, podemos observar como el ayuno de KCl induce el incremento de la fosforilación relativa de la quinasa Sch9 (P/total) tanto en células WT como en células mutantes *hal4 hal5* y *trk1 trk2*. Especialmente en un mutante *trk1 trk2*, en condiciones de potasio en el medio, la fracción fosforilada de Sch9 también es superior a la de las células WT. Estos resultados nos estarían indicando que Sch9 se activa con concentraciones limitantes de KCl. En el panel B, se muestran los resultados de los niveles de fosforilación relativos de la quinasa Ypk1 (P/total), el sustrato de TORC2.

Podemos observar que las cepas mutantes *hal4 hal5* y *trk1 trk2* presentan niveles de fosforilación de Ypk1 menores, con independencia del tratamiento.

Este experimento se realizó en más de tres clones, así como en los dos fondos genéticos BY4741 y W303-1A empleados en este trabajo de Tesis Doctoral. Además fue realizado en diferentes condiciones, con resultados similares.

Con el fin de establecer si los cambios en la fosforilación de Sch9 y Ypk1 son estadísticamente significativos, cuantificamos los niveles de fosforilación relativos. Calculamos la media y la desviación estándar de todos los experimentos realizados (Figura 62).

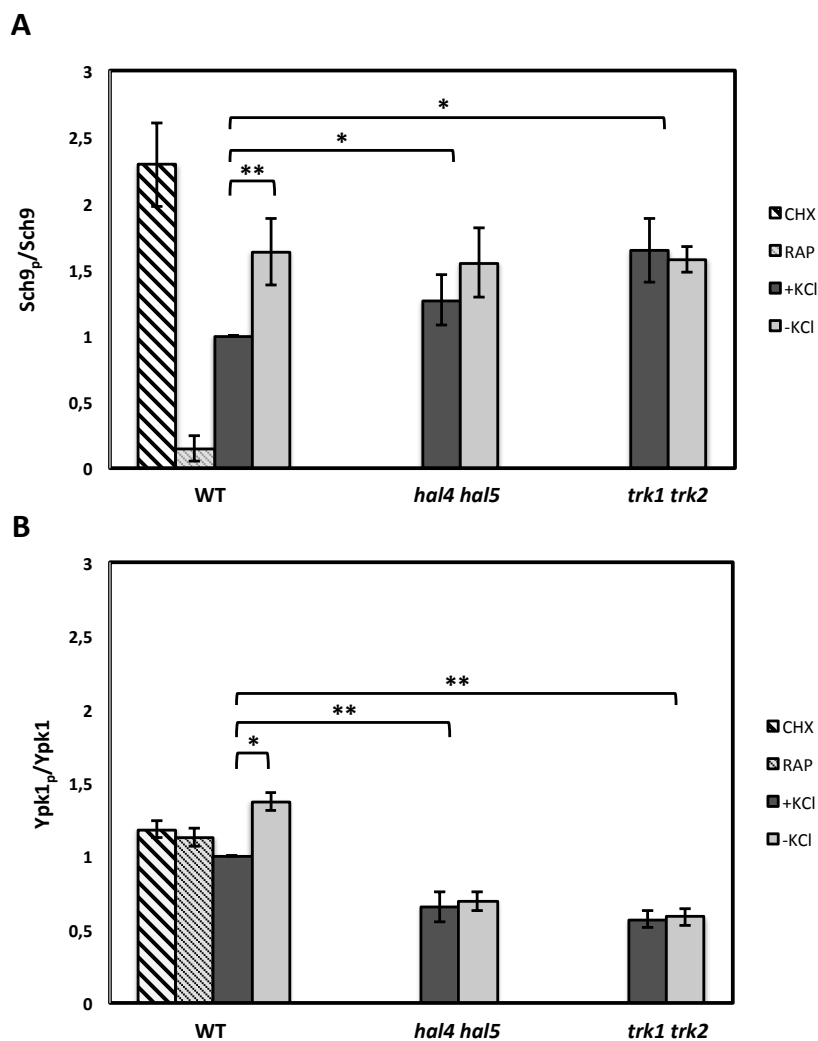


Figura 62. Cuantificación de los niveles de fosforilación relativos de las quinasas Sch9 y Ypk1 en la cepa silvestre y las cepas mutantes *hal4 hal5* y *trk1 trk2* en condiciones de ayuno de KCl. Los niveles de fosforilación de Sch9 (A) y Ypk1 (B) se determinaron como se describe en la figura 61. En la gráfica se muestran los valores medios y la desviación estándar de los datos correspondientes a cuatro experimentos independientes. Se llevó a cabo un análisis estadístico *t de Student*. El asterisco (**) indica que existe significación estadística con un valor $p < 0.01$ respecto a la cepa control (cepa silvestre cultivada en medio *Translucent* con suplemento de KCl 50 mM). El asterisco (*) indica que existe significación estadística con un valor $p < 0.05$ respecto a la cepa control.

Los valores de cuantificación de los niveles de fosforilación de Sch9 y Ypk1 (Figura 62) confirman los resultados obtenidos por *Western blot* (Figura 61). Los valores de fosforilación de Sch9 (Sch9p/Sch9) en las cepas mutantes *hal4 hal5* y *trk1 trk2* sin tratar (+KCl), son superiores a los valores de una cepa silvestre también sin tratamiento. Sin embargo, cuando realizamos el ayuno de potasio, observamos como los valores de fosforilación en las tres cepas aumentan o se mantienen (altos). De estos resultados podemos afirmar que específicamente las condiciones de ayuno de KCl (y no la ausencia de las quinasas Hal4 y Hal5) inducen la fosforilación de Sch9.

En el caso de evaluar los valores relativos de la fosforilación de Ypk1 (Ypk1p/Ypk1) (Figura 61 y 62, panel B), los resultados claramente indican que la proteína quinasa Ypk1 sufre una reducción de aproximadamente el 50% de su fosforilación en las cepas mutantes *hal4 hal5* y *trk1 trk2*. Esta reducción es independiente del tratamiento de ayuno de potasio. Por otro lado, observamos un ligero incremento en la fosforilación en la cepa silvestre ante condiciones de ayuno de KCl. Podemos afirmar por tanto que el KCl no representa ningún efecto sobre el complejo TORC2.

Respecto a la disminución observada en los niveles de fosforilación de Ypk1 en los mutantes *hal4 hal5* y *trk1 trk2* independiente de la señal de potasio, no tenemos una explicación para este fenotipo de momento, pero es probable que tenga que ver bien con la hiperpolarización de la membrana o con el pH más ácido que presentan ambas cepas. Pero se requieren más experimentos para corroborar estas hipótesis.

Estos experimentos se realizaron durante mi estancia predoctoral en el laboratorio del Profesor Doctor Robbie Joseph Loewith, en la Universidad de Ginebra.

2. Análisis fisiológico de la posible relación funcional entre la ruta TOR y la homeostasis de iones

2.1. Análisis fenotípico de los mutantes viables de los componentes de los complejos TORC1 y TORC2 en diferentes condiciones

Una manera de relacionar funcionalmente una cepa con una posible implicación en la homeostasis de iones es comprobar la sensibilidad/tolerancia a LiCl. Una mayor sensibilidad a dicho catión puede indicar una hiperpolarización de la membrana plasmática (interior más negativo) o la incapacidad de expulsar Li⁺. Sin embargo, cepas tolerantes a dicho catión implican una reducción del potencial de membrana debida a una mayor acumulación de carga positiva en su interior (H⁺ o K⁺) o a una capacidad mayor para bombear Li⁺ hacia el exterior celular. Por ejemplo, mutantes *hal4 hal5* y

trk1 trk2 son sensibles a LiCl, mientras que mutantes que acumulan potasio, como *ppz1* o *ppz1 ppz2* son tolerantes (Mulet et al., 1999; Yenush et al., 2002).

Algunos autores han observado que el mutante *tor1* es sensible a sal. Este fenotipo evidencia un problema de estas células para responder al estrés salino, al menos en parte debido a un defecto en la inducción del gen *ENA1* que codifica para la proteína responsable de bombear sodio (o litio) al exterior de la célula (Crespo et al., 2001). También ha sido publicado que el mutante *tco89* es sensible a dicho estrés (Zheng et al., 2007). Estos datos demuestran que el complejo TOR1 es necesario para el crecimiento bajo diferentes condiciones de estrés, pero no aclaran si estos defectos están relacionados con la toma de potasio.

Con el objetivo de estudiar si existe una relación funcional entre los componentes de los complejos TORC1, TORC2 y el K^+ , decidimos realizar un análisis fenotípico del crecimiento en medio sólido y en medio líquido YPD suplementado con LiCl 100 mM de los mutantes para los componentes del complejo TOR1 (TORC1), *tor1* y *toc89* y algunos componentes del complejo TOR2 (TORC2), que incluyen los mutantes *avo2* y *bit61*. También se incluyeron las cepas *hal4 hal5* y *trk1 trk2* como controles de niveles intracelulares de potasio bajo. El resto de mutantes de los otros componentes de ambos complejos no se pudieron emplear por su efecto letal (Loewith et al., 2002).

En la figura 63, panel A, se observan los fenotipos de crecimiento en medio sólido YPD con LiCl. Como ya sabíamos, las cepas con defectos en la toma de KCl *hal4 hal5* y *trk1 trk2*, son sensibles a LiCl (Mulet et al., 1999). También se observa sensibilidad a LiCl, aunque menos acusada, en la cepa *tco89*. Tras el análisis del crecimiento de todas estas cepas en medio líquido YPD suplementado con LiCl 100 mM (Figura 63, panel B), comprobamos una mayor sensibilidad de los mutantes *tco89*, *hal4 hal5* y *trk1 trk2*. El resto de cepas mutantes muestran idéntico fenotipo a una cepa silvestre en ambos experimentos.

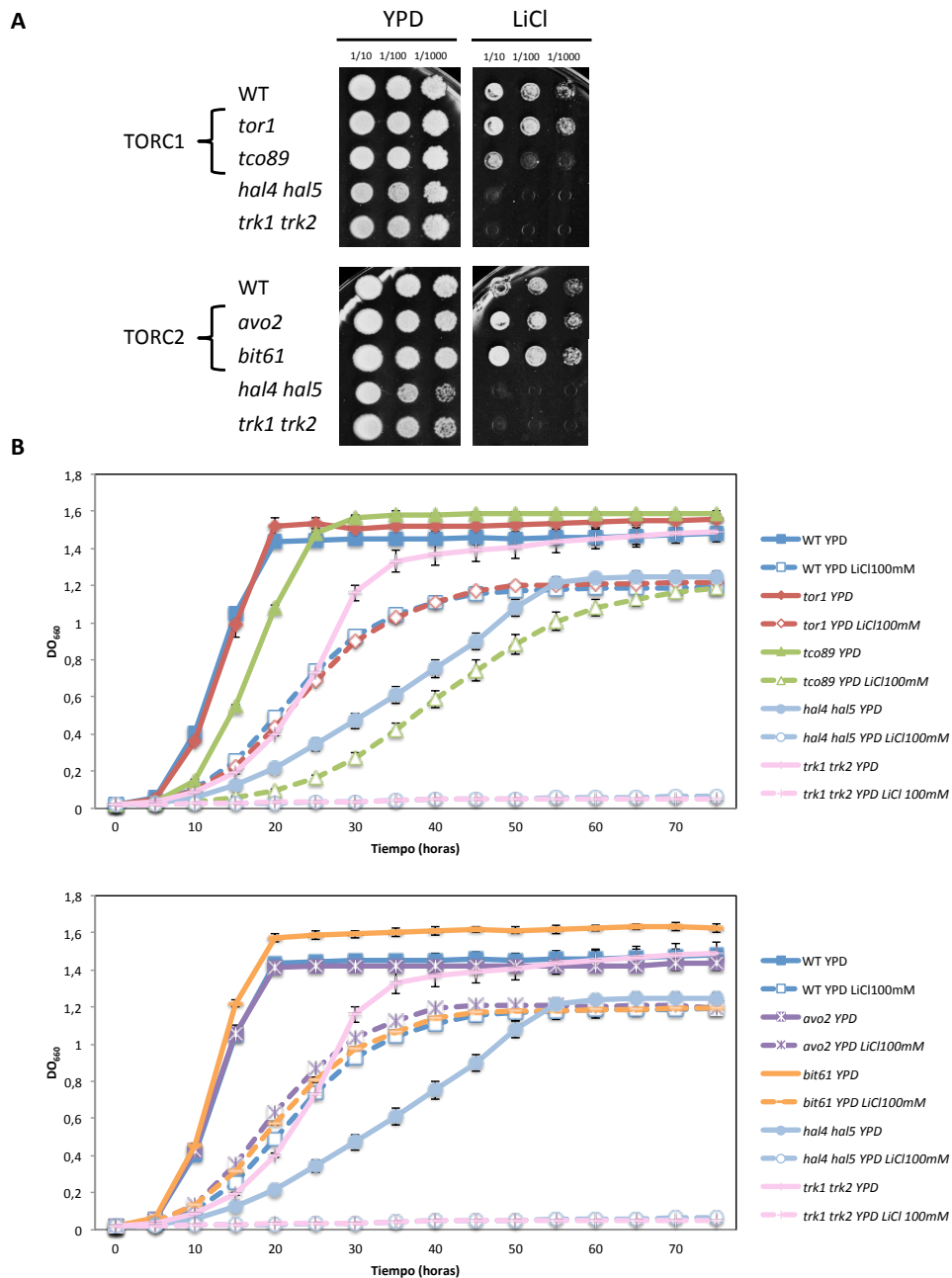


Figura 63. Ensayos de crecimiento de una cepa silvestre y de los mutantes *tor1*, *tco89*, del complejo TORC1, *avo2*, *bit61*, del complejo TORC2, *hal4 hal5* y *trk1 trk2* en medio YPD e YPD suplementado con LiCl 100 mM. (A) Fenotipos de crecimiento en medio sólido YPD con y sin suplemento de LiCl 100 mM de las cepas indicadas. Las células se crecieron hasta saturación en medio YPD y se analizó el crecimiento en medio sólido (A) y medio líquido (B) como se describe en Materiales y Métodos.

Aunque no hemos sido capaces de observar la sensibilidad a sal descrita para un mutante *tor1* (sí su sensibilidad a rapamicina) (Crespo et al., 2001), es posible que estas diferencias se deban a que el fondo genético testado es diferente, como sugieren algunos autores que han observado diferencias en la tolerancia a sal según el fondo genético (Krauke and Sychrova, 2010).

En paralelo analizamos el crecimiento de estas cepas en medio *Translucent*. Este medio nos permite detectar defectos en el crecimiento originados por los bajos niveles de actividad del sistema Trk y que podrían estar relacionados con defectos en el crecimiento en presencia de LiCl. En la figura 64 se muestran los resultados obtenidos con los ensayos de crecimiento en medio líquido de esta batería de mutantes en medio *Translucent* suplementado con diferentes concentraciones de KCl. Cabe recordar que si no añadimos KCl al medio *Translucent*, este medio posee una concentración de KCl menor a 15 μ M.

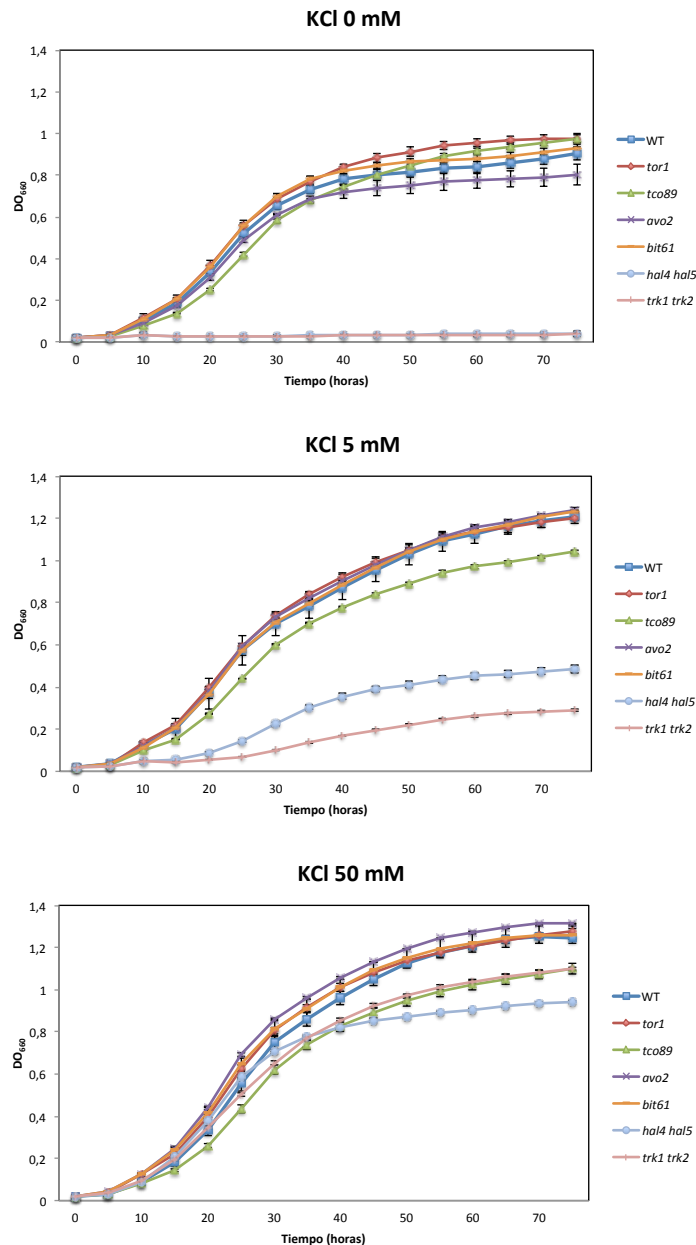


Figura 64. Ensayos de crecimiento de los mutantes *tor1*, *tco89*, del complejo TORC1, *avo2*, *bit61*, del complejo TORC2, *hal4 hal5* y *trk1 trk2* en medio líquido *Translucent* suplementado con diferentes concentraciones de KCl. Las cepas indicadas del fondo genético BY4741 se crecieron hasta saturación en medio YPD. Posteriormente se midió el crecimiento en el medio líquido que se indica en cada caso, como se describe en Materiales y Métodos.

En el análisis del crecimiento en medio líquido *Translucent* sin suplemento externo de KCl (0 mM KCl) se observa que, salvo los mutantes *hal4 hal5* y *trk1 trk2*, que son incapaces de crecer en dicho medio, todas las demás cepas mutantes muestran un patrón de crecimiento similar a la cepa silvestre, alcanzando un rendimiento final (DO_{660} en fase estacionaria) de aproximadamente 1. Por otro lado, con una concentración limitante de KCl 5 mM se observan varios patrones de crecimiento que podrían agruparse en tres grupos distintos. El grupo 1, incluye a la cepa silvestre y a las cepas mutantes *tor1*, *avo2* y *bit61*. Estas cepas muestran un crecimiento equivalente a la cepa silvestre, alcanzando un rendimiento final de aproximadamente 1.2 (DO_{660} 1.2), superior al observado en medio con KCl 0 mM (DO_{660} 1). El grupo 2, incluye a la cepa mutante *tco89* del complejo TORC1. Esta cepa se caracteriza por presentar un crecimiento inferior a la cepa silvestre (grupo 1), aunque no presenta diferencias con respecto a su crecimiento sin suplemento de KCl (0 mM). El grupo 3, que incluye a las cepas *hal4 hal5* y *trk1 trk2*, se define por presentar un crecimiento incluso inferior al grupo 2. Por último, en condiciones de KCl 50 mM, podemos observar como todas las cepas presentan un crecimiento similar, aunque el rendimiento de los mutantes *hal4 hal5*, *trk1 trk2* y *tco89* es ligeramente inferior (en comparación con la cepa silvestre).

El conjunto de todos estos datos nos estaría indicando varios aspectos funcionales sobre el potasio y los componentes de TORC1 y TORC2. Por un lado, los resultados indican que el KCl es importante para el crecimiento celular. Suplementar el medio con KCl (5 mM y 50 mM) incrementa en el rendimiento final de las cepas. Por otro lado, hemos observado que la cepa *tco89* presenta un menor rendimiento ante concentraciones limitantes de KCl (5 mM). Sin embargo, aunque se ha observado un retraso en el crecimiento del mutante *tco89* en presencia de LiCl, su defecto en el crecimiento en condiciones limitantes de potasio es muy leve. El defecto en el crecimiento de esta cepa es mucho menos acusado al de las cepas *hal4 hal5* y *trk1 trk2*. Por tanto, a nivel de crecimiento celular no hemos obtenido evidencias que indiquen que los mutantes de los complejos TORC1 y TORC2 posean defectos en la actividad del sistema Trk.

2.2. Análisis de la relación funcional entre la homeostasis de iones y la ruta TOR a través de la rapamicina

Como abordaje adicional para estudiar la posible relación funcional entre la ruta TOR y el KCl, se analizaron los fenotipos de crecimiento en medio sólido YPD con rapamicina (un potente inhibidor de la ruta TORC1) de una serie de mutantes relacionados con la homeostasis de iones como son los mutantes *ptk2*, *brp1*, *ppz1*, *hal4 hal5* y *trk1 trk2* (Figura 65). El mutante *brp1* posee una delección parcial del promotor de *PMA1* y por tanto presenta una disminución de la actividad de esta H^+ -ATPasa de la membrana plasmática (Barreto et al., 2011). *PTK2* codifica para una proteína quinasa que activa

Pma1 (Goossens et al., 2000). En ambos mutantes, debido a la reducción de la actividad de Pma1, el pH citosólico es más ácido y la toma de aminoácidos se ve reducida. Estos dos fenotipos también se observan en mutantes *hal4 hal5* y *trk1 trk2* (Yenush et al., 2002; Navarrete et al., 2010; Perez-Valle et al., 2010). Sin embargo, tanto *brp1* como *ptk2* son tolerantes a concentraciones tóxicas de LiCl (Barreto et al., 2011, Goossens et al., 2000), mientras que los mutantes *hal4 hal5* y *trk1 trk2* son sensibles debido a la reducida acumulación de potasio. Por otro lado, mutantes en la proteína fosfatasa *PPZ1* acumulan más potasio que las cepas silvestres y presentan un pH intracelular más alcalino, un incremento en la toma de aminoácidos así como tolerancia a cationes tóxicos (Yenush et al., 2002). Por tanto, el hecho de utilizar estos mutantes nos permite distinguir entre fenotipos que son debidos a reducción o acumulo de potasio interno o a alteraciones en la toma de aminoácidos.

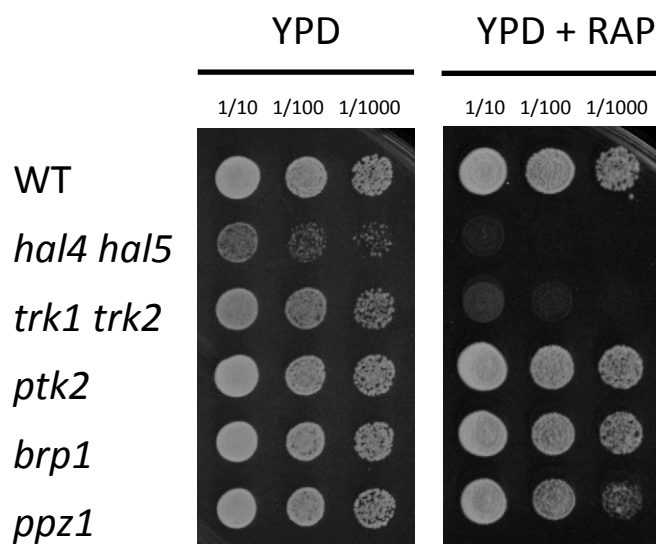


Figura 65. Ensayos de crecimiento de una cepa silvestre y de los mutantes *hal4 hal5*, *trk1 trk2*, *brp1*, *ptk2* y *ppz1* en medio sólido YPD con rapamicina. Fenotipos de crecimiento de las cepas indicadas del fondo genético BY4741 en placas de medio YPD con rapamicina 10 ng/ml. Las células se crecieron hasta saturación. Posteriormente se realizaron diluciones seriadas y se depositaron en placas sólidas de los medios indicados. Se tomaron imágenes del crecimiento después de 48-72h de incubación a 28°C. Este experimento se repitió en tres clones independientes.

Las cepas *hal4 hal5* y *trk1 trk2* son sensibles a rapamicina, sin embargo, no lo son el resto de mutantes probados. A dosis bajas de rapamicina (10 ng/ml) los mutantes *ptk2*, *brp1* y *ppz1* presentan el mismo fenotipo que la cepa silvestre. Estos resultados sugieren que el fenotipo de sensibilidad de una cepa carente de las quinasas Hal4 y Hal5 y de una cepa *trk1 trk2* es debido a los defectos en la toma de KCl y no a su pH citosólico ácido, reducida actividad de Pma1 o reducida toma de aminoácidos. También se ha observado una menor sensibilidad (respecto a la cepa silvestre) a altas dosis de rapamicina (200 ng/ml) en los mutantes *ptk2* y *brp1*, especialmente en este último (datos no mostrados).

Tras los resultados obtenidos, decidimos analizar el fenotipo de estas cepas *hal4 hal5* y *trk1 trk2* en medio YPD con rapamicina en presencia de suplemento de KCl. Establecimos la hipótesis de que si el fenotipo de sensibilidad a rapamicina es debido a un defecto en la toma de potasio, un exceso de potasio en el medio rescataría el fenotipo de sensibilidad a rapamicina de estas cepas. Para comprobar la hipótesis se prepararon placas de YPD con suplemento de KCl 0.5 M y rapamicina. Como control de presión osmótica se prepararon estas mismas placas de YPD con rapamicina y con el equivalente en sorbitol (Figura 66).

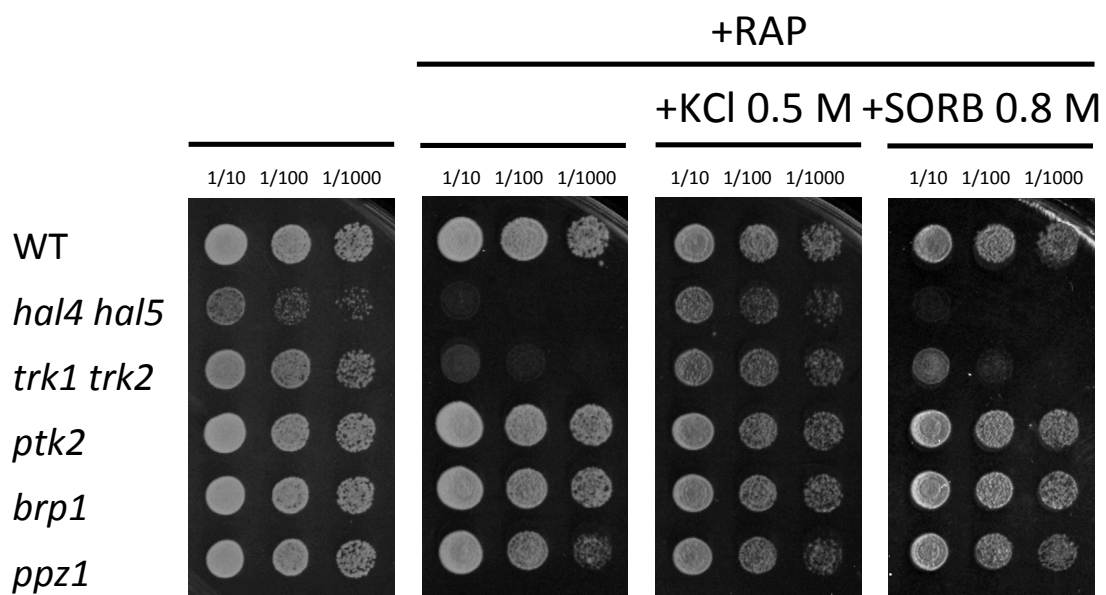


Figura 66. Ensayos de crecimiento de una cepa silvestre y de los mutantes *ptk2*, *brp1*, *ppz1*, *hal4 hal5* y *trk1 trk2* en medio sólido YPD con rapamicina sin y con suplemento de KCl o sorbitol. Fenotipos de crecimiento en placas de medio YPD con rapamicina 10 ng/ml y con y sin suplemento de KCl 0.5 M o el equivalente en sorbitol 0.8 M (SORB) de las cepas indicadas del fondo genético BY4741. Las células se crecieron hasta saturación. Posteriormente se realizaron diluciones seriadas y se depositaron en placas sólidas de los medios indicados. Se tomaron imágenes después de 48-72h de incubación a 28°C. Este experimento se repitió en tres clones independientes.

De la figura 66 destacan varios aspectos. En primer lugar, como ya habíamos observado en la figura 65, los mutantes con niveles intracelulares de KCl bajos como son las cepas mutantes *hal4 hal5* y *trk1 trk2* presentan sensibilidad a rapamicina. En segundo lugar, observamos que cuando suplementamos con KCl las placas de YPD con rapamicina, hay un rescate de la sensibilidad a rapamicina de estas cepas con defectos en la toma de KCl. En tercer lugar, podemos descartar que dicho rescate sea debido al efecto osmótico del KCl puesto que la concentración de sorbitol equivalente no rescata la sensibilidad a rapamicina de dichos mutantes.

3. Estudio del efecto de la rapamicina en el contenido de potasio intracelular

Tras el rescate observado en la sensibilidad a rapamicina de la cepa *hal4 hal5* y *trk1 trk2* por altas concentraciones de KCl (0.5 M), planteamos la hipótesis de que la rapamicina, entre sus muchos efectos, pueda inhibir la toma de potasio. Esto explicaría que las cepas con defectos en la toma de KCl como son las cepas mutantes *hal4 hal5* y *trk1 trk2* sean rescatadas con altas concentraciones de KCl.

Para abordar esta hipótesis cultivamos la cepa silvestre y las cepas mutantes *fpr1* y *trk1 trk2* en YPD. Una vez en fase logarítmica las tratamos con rapamicina o su disolvente (control). Posteriormente analizamos los niveles intracelulares de KCl (Figura 67). El mutante *fpr1* fue elegido como control, puesto que este gen codifica para la proteína necesaria para la unión entre la rapamicina y Tor1 o Tor2, del complejo TORC1, por lo tanto es insensible a la inactivación de TORC1 por dicha droga (Heitman et al., 1991a; Heitman et al., 1991b; Schreiber 1991). El uso de este control permite discernir si el efecto de la rapamicina sobre los niveles intracelulares de potasio es dependiente o no de TORC1.

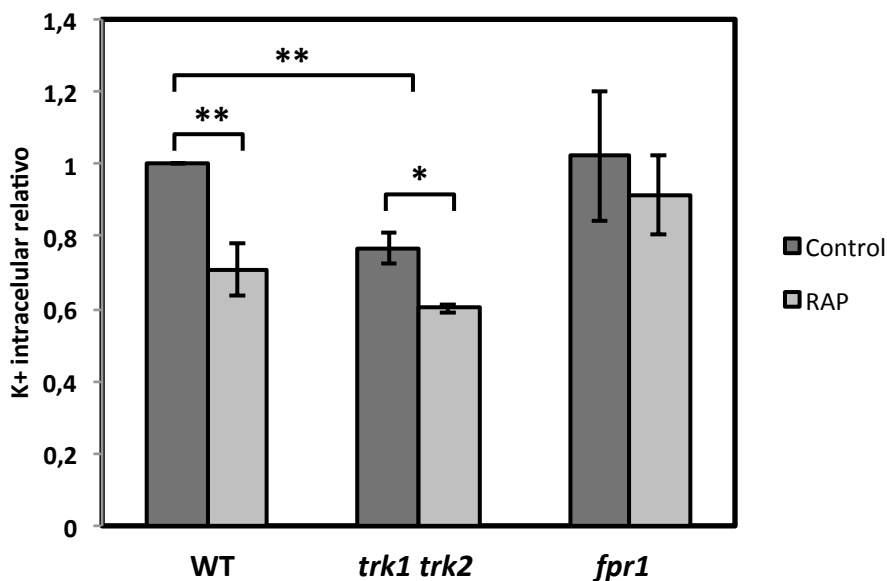


Figura 67. Contenido intracelular de potasio en una cepa silvestre y en los mutantes *trk1 trk2* y *fpr1* ante un tratamiento con rapamicina. Células de la cepa silvestre, *trk1 trk2* y *fpr1* fueron crecidas en YPD hasta fase logarítmica y tratadas con 200 ng/ml de rapamicina (RAP) o el volumen equivalente de su disolvente (control) durante 60 minutos. Se tomaron muestras para la determinación del contenido de potasio intracelular. Se tomó como valor de referencia 1 a la cantidad de potasio intracelular de células de la cepa silvestre cultivadas en medio YPD no tratadas con rapamicina (control). Se analizaron tres réplicas biológicas. Los niveles relativos de potasio intracelular se expresan como la media \pm el error estándar. Se llevó a cabo un análisis estadístico *t de Student* con los datos correspondientes a tres experimentos independientes. Dos asteriscos (**) indican que existe significación estadística con un valor $p < 0.01$. Un asterisco (*) indica que existe significación estadística con un valor $p < 0.05$.

La rapamicina sí supone la disminución del contenido intracelular de potasio, tanto en la cepa silvestre como en la cepa doble mutante *trk1 trk2*. Cabe destacar que los niveles intracelulares de potasio de una cepa *trk1 trk2* son de partida inferiores a los de una cepa silvestre, como ya habían descrito otros autores (Yenush et al., 2002). Sin embargo, el mutante *fpr1* no presenta dicha disminución del contenido de potasio intracelular. Sus niveles intracelulares de potasio son similares a los de la cepa silvestre con independencia del tratamiento. A partir de estos resultados podemos afirmar que la rapamicina supone la disminución del contenido intracelular de potasio de forma dependiente de TORC1 e independiente del sistema de toma de potasio de alta afinidad Trk1-Trk2. Este resultado es consistente con el rescate de la sensibilidad a rapamicina por alto potasio de los mutantes *hal4 hal5* y *trk1 trk2*. La reducción en la concentración de potasio observada al inhibir TORC1, explica la sensibilidad de los mutantes *hal4 hal5* y *trk1 trk2* a rapamicina. Sin embargo, no podemos distinguir si la rapamicina posee un efecto sobre la toma y/o la extrusión de potasio.

Discusión

Las proteínas quinasa Hal4 y Hal5 fueron identificadas como reguladores positivos del sistema de transporte de alta afinidad Trk1-Trk2 (Mulet et al., 1999). Algunas evidencias que demuestran esta afirmación son los bajos niveles intracelulares de KCl de la cepa *hal4 hal5* que la incapacitan para crecer en medio mínimo sin suplemento de KCl y sus bajos niveles de toma de rubidio (un análogo del KCl) que son próximos a los del doble mutante *trk1 trk2*. Otra observación es que la sobreexpresión de *HAL4* y/o *HAL5* sólo confiere tolerancia a cationes tóxicos en células que expresan los transportadores de potasio Trk1 y Trk2. Más tarde, en el 2007, Pérez-Valle y colaboradores identificaron que estas quinastas son necesarias para estabilizar en la membrana plasmática transportadores como Trk1, Can1, Fur4, Gap1 o Hxt1, en condiciones de potasio limitante.

Como abordaje adicional al estudio de los fenotipos del mutante *hal4 hal5* también se realizó un análisis exhaustivo de su transcriptoma. Los resultados obtenidos por nuestro grupo, algunos de los cuales forman parte de esta Tesis Doctoral, indicaron que una cepa carente de las quinastas Hal4 y Hal5 presenta alteraciones en el control general del metabolismo del nitrógeno y el carbono (Perez-Valle et al., 2010).

En relación al metabolismo energético, se ha detectado una mayor acumulación de los transcritos pertenecientes a las categorías funcionales de biosíntesis de ATP, metabolismo aeróbico y el transporte de electrones, que podrían estar reflejando alguna alteración en los niveles del metabolismo aeróbico. Consistente con estos datos, en este trabajo hemos observado también que la cepa *hal4 hal5* presenta menores niveles de consumo de glucosa y producción de etanol y un incremento en la actividad de la enzima mitocondrial succinato deshidrogenasa (SDH) (indicando un desplazamiento del metabolismo energético hacia la respiración). Sin embargo, la morfología de las mitocondrias no presenta ninguna alteración con respecto a la cepa silvestre (Perez-Valle et al., 2010). También en estudios previos se había observado una deslocalización del transportador de glucosa de baja afinidad Hxt1 en ausencia de suplemento de potasio en el mutante *hal4 hal5*, consistente con los datos anteriores (Perez-Valle et al., 2007). Esta reducción del flujo glucolítico observada en una cepa *hal4 hal5* podría explicar esta inducción del metabolismo respiratorio con el objetivo de mejorar la producción energética celular.

Respecto a las alteraciones observadas en el metabolismo del nitrógeno, en este trabajo observamos que los niveles de toma de metionina del mutante *hal4 hal5* son inferiores a los de una cepa silvestre. Ello podría justificar el aumento transcripcional de los genes relacionados con la biosíntesis de metionina, como estrategia para compensar el déficit de este aminoácido. También se ha observado la activación de la

ruta GCN, indicador de un estado general de ayuno de aminoácidos. Consistente con estos datos también se ve reducida en una cepa *hal4 hal5* la toma de otros aminoácidos como la leucina. Estos defectos en la toma de aminoácidos se correlacionan con su pH más ácido y su menor actividad de Pma1 (con respecto a una cepa silvestre) ya que se ha descrito que la toma de aminoácidos es dependiente del gradiente de protones (Perez-Valle et al., 2010; Vallejo and Serrano, 1989). En el análisis transcripcional también, entre otros, aparecen como reprimidos los transcritos de la categoría funcional de biosíntesis de aminoácidos. La mayor parte de estos genes son genes catabólicos. Es posible que con el fin de aprovechar mejor los nutrientes disponibles y ante los defectos en la toma de aminoácidos se produzca una represión del catabolismo de aminoácidos. Sin embargo, cabe destacar que suplementar el medio con aminoácidos sólo mejora parcialmente los fenotipos de esta cepa.

Las quinasas Hal4 y Hal5, como ya se ha descrito, desempeñan un papel en la regulación de la estabilidad de diferentes transportadores presentes en la membrana plasmática como Trk1, Can1, Fur4, Gap1 o Hxt1 (Perez-Valle et al., 2007). En este trabajo hemos observado una acumulación vacuolar de la permeasa de alta afinidad de metionina Mup1 que podría explicar el defecto observado en la toma de metionina en el doble mutante *hal4 hal5*. Hemos identificado que la deslocalización de Mup1 es debida a un incremento en la tasa de endocitosis (observado tras la adición de Latrunculina A) y por tanto hemos establecido que la endocitosis es necesaria para el acumulo de Mup1 en la vacuola en el mutante *hal4 hal5*, y probablemente de otras permeasas que también se hayan alteradas en este mutante. Apoyando el fenotipo de ayuno de metionina, también hemos identificado un defecto en el tráfico hacia la membrana de Mup1 en ausencia de las quinasas Hal4 y Hal5. Estos datos refuerzan el papel de las quinasas Hal4 y Hal5 en el mecanismo general de regulación de la estabilidad de las permeasas de la membrana plasmática que implica la vía endocítica y sugieren un posible papel de las quinasas Hal4 y Hal5 en la regulación de la llegada y/o el reciclaje de Mup1 hacia la membrana plasmática.

Consistente con un papel de Hal4 y Hal5 en el control de la endocitosis y posterior degradación vacuolar de múltiples permeasas, hemos observado que el fenotipo de los mutantes *hal4 hal5* es similar al de cepas que expresan una versión activa de la E3 Ub ligasa Rsp5. Específicamente hemos observado que mutantes *hal4 hal5* son tolerantes al análogo tóxico de la prolina AZC. La mayor tolerancia constitutiva al AZC observada en la cepa *hal4 hal5* es consistente con unos resultados publicados en el 2007 de Pérez Valle y colaboradores donde observaron una menor acumulación de Gap1-GFP en la membrana plasmática en una cepa *hal4 hal5* (medio con prolina). Esta menor acumulación debe ser responsable de la menor entrada de AZC y mayor tolerancia a este compuesto. Los ensayos de crecimiento sin suplemento de potasio relacionan a Rsp5 con la actividad de Trk. La versión activa de Rsp5 genera un retraso en el

crecimiento de la cepa silvestre en medio *Translucent* sin suplemento de potasio. Sin embargo, la versión de Rsp5 inactiva no rescata el crecimiento de una cepa *hal4 hal5* en dicho medio. Este resultado indica que esta versión menos activa de Rsp5 no actúa como dominante negativo en mutantes *hal4 hal5*. Los fenotipos de acumulación vacuolar observados en una cepa carente de las quinasas Hal4 y Hal5 son similares a los fenotipos de hiperactividad de Rsp5 y el hecho de que la expresión de la versión activa de Rsp5 retrasa el crecimiento del mutante *hal4 hal5* apoya esta hipótesis. Estos dos fenotipos son aditivos sugiriendo que Hal4 y Hal5 no regulan Rsp5, al menos por cambios en la fosforilación de la treonina 357. Sin embargo, no podemos descartar la existencia de posibles sitios de fosforilación adicionales y dianas de estas quinasas. En ausencia de las quinasas, las dianas potenciales en Rsp5 no podrían ser fosfoinhibidas y como resultado originaría una mayor actividad de Rsp5. Cabe destacar que hay 9 sitios de fosforilación adicionales listados para Rsp5 en la base de datos de Phosphogrid (www.phosphogrid.org), aunque el único que ha sido estudiado en detalle es el de la T357.

Otra posibilidad para explicar los fenotipos de acumulo vacuolar de varias permeasas y transportadores observados en una cepa *hal4 hal5* sería la mayor actividad de la familia de adaptadores ARTs. Las quinasas Hal4 y Hal5 podrían estar impidiendo modificaciones post-traduccionales como la ubiquitinación de las permeasas por medio de fosforilaciones en las proteínas adaptadoras de Rsp5. Aunque no parece probable que la regulación sea directa puesto que no hemos encontrado ninguna interacción proteína-proteína entre Hal4 y ningún miembro de la familia ARTs, con los análisis realizados en la cepa *hal4 hal5 art1* confirmamos que ART1 es el responsable de mediar (al menos en parte) la internalización de Can1 y Mup1 en condiciones de exceso de su sustrato en una cepa carente de las quinasas Hal4 y Hal5. Sin embargo, en condiciones de KCl limitante, Art1 no participa en dicho proceso de internalización de estos transportadores Can1 y Mup1 ni tampoco de Trk1. Debido a la especificidad de la relación entre el *cargo* y el estímulo, así como de la redundancia de los ARTs, puede ser que en condiciones de potasio limitante el adaptador específico de Rsp5 que media la endocitosis de estas permeasas sea diferente a Art1. También es posible que exista una redundancia funcional con otros ARTs, como se ha descrito para el transportador de manganeso Smf1 que requiere los adaptadores Art2 y Art8 (Nikko et al., 2008). Sin embargo, cabe destacar que aunque los resultados indican que las rutas en las que trabajan las quinasas Hal4 y Hal5 y Art1 son independientes, están de alguna manera conectadas puesto que sí se observan alteraciones en la expresión y/o movilidad electroforética de los transportadores analizados en la cepa *hal4 hal5 art1*. Por ejemplo, la menor acumulación observada en la membrana plasmática de Trk1 en una cepa *hal4 hal5 art1* podría indicar un papel para este adaptador en el tráfico de Trk1 hacia la membrana plasmática.

En conjunto, nuestros datos sugieren que las quinasas Hal4 y Hal5 están implicadas en la regulación de la endocitosis y posterior degradación de los transportadores Mup1, Can1 y Trk1 por un mecanismo adicional al papel descrito para Art1.

De modo general, podemos afirmar que las quinasas Hal4 y Hal5 participan en la regulación de la estabilidad de un conjunto de permeasas de la membrana plasmática. Específicamente inhiben la degradación vacuolar de varias permeasas cuya degradación, inducida por sustrato, viene mediada por diferentes miembros de la familia ARTs. La estabilidad del transportador Dip5 también se ve alterada en condiciones de potasio limitante y exceso de sustrato en un mutante *hal4 hal5*. Sin embargo, en este caso, el fenotipo observado es diferente (acumulación de compartimentos pre-vacuolares) sugiriendo que las quinasas pueden afectar al tráfico de diferentes maneras o en diferentes puntos del tráfico desde la membrana a la vacuola. Estos datos también podrían sugerir una relación entre las quinasas Hal4, Hal5 y al menos Art1 y Art3. Parece que en función del adaptador, el papel de las quinasas Hal4 y Hal5 en la estabilidad de los transportadores de la membrana plasmática varía. En el caso de permeasas reguladas por Art1, la ausencia de las quinasas favorece la acumulación del transportador en la vacuola en condiciones de exceso de sustrato y de KCl limitante, mientras que en el caso de permeasas reguladas por Art3, el papel de estas consiste en la prevención/retraso de dicha acumulación vacuolar en compartimentos pre-vacuolares. Estos datos son consistentes con las diferentes funciones de la quinasa Npr1 en la regulación del tráfico de permeasas. El tráfico de permeasas a la vacuola viene mediado a través de adaptadores como Art1 o Bul1 y Bul2. El papel en el tráfico hacia la membrana viene mediado a través de Art3 (De Craene et al., 2001; Merhi and Andre, 2012; O'Donnell et al., 2010; MacGurn et al., 2011; Abe and Iida, 2003; Nikko and Pelham, 2009).

De manera similar a los fenotipos observados en una cepa *hal4 hal5*, el mutante *npr1* presenta una inestabilidad de Dip5 en la fracción insoluble (datos no mostrados). Este fenotipo ha sido observado también con otras permeasas de nutrientes de la membrana plasmática como Tat2 o Can1 (Schmidt et al., 1998; MacGurn et al., 2011). Ante estos datos parece probable que un defecto en la expresión y/o actividad de Npr1 pueda estar ocasionando los fenotipos de inestabilidad de los transportadores en la membrana plasmática.

En este trabajo hemos observado que los niveles de expresión de Npr1 en una cepa carente de las quinasas Hal4 y Hal5 son aproximadamente un 30% inferiores a los de una cepa silvestre. Estos niveles se ven incluso más reducidos en condiciones limitantes de potasio. Este efecto es específico de la ausencia de las quinasas. Esto podría explicar las diferencias observadas en cuanto a otros fenotipos entre las cepas *hal4 hal5* y *trk1 trk2* (inestabilidad de los transportadores en la membrana plasmática,

activación ruta GCN etc.). Además, estas alteraciones en la expresión de Npr1 en una cepa *hal4 hal5* y en condiciones limitantes de KCl se producen mayoritariamente a nivel post-traducciona. Respecto a la actividad de Npr1, esta viene principalmente regulada por la ruta de señalización TOR a través de la fosforilación (Schmidt et al., 1998). Hemos identificado que los niveles de fosforilación de Npr1 en una cepa *hal4 hal5* son superiores (hiperfosforilación), especialmente en condiciones de ayuno de potasio. Podemos por tanto afirmar que el efecto sobre la fosforilación de Npr1 es debido principalmente a las quinasas Hal4 y Hal5, aunque también hemos observado una contribución del potasio.

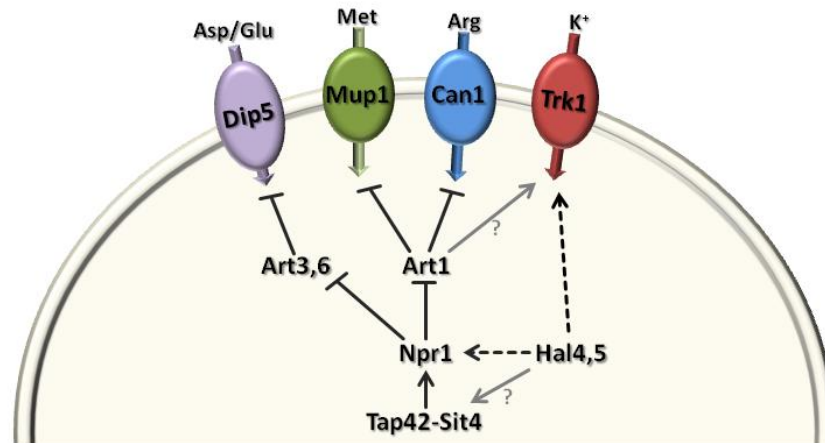
Puesto que no parece probable que Hal4 y Hal5 regulen directamente Npr1 (Npr1 está hiperfosforilado en ausencia de las quinasas), planteamos la posibilidad de que Hal4 y Hal5 estén regulando el complejo de fosfatasas que contiene la proteína reguladora Tap42. Pruebas como que un mutante *sit4* también presenta niveles de hiperfosforilación de Npr1 (Jacinto et al., 2001; González et al., 2009) o la posible interacción genética descrita entre Hal4 y Sit4, sustentan esta hipótesis (Muñoz et al., 2003). Puesto que actualmente se han propuesto dos modelos de regulación del complejo Tap42-Sit4 (Jacinto et al. 2001; Yan et al., 2006), la implicación de las quinasas Hal4 y Hal5 (de acuerdo a ellos) en la regulación del complejo de fosfatasas sería diferente. Planteamos como primer abordaje analizar una posible alteración en la expresión y/o movilidad electroforética de Tap42 y Sit4 en mutantes *hal4 hal5*, de la misma manera que hemos analizado la quinasa Npr1.

El análisis del efecto de la sobreexpresión de *NPR1* en una cepa *hal4 hal5* indica que *NPR1* es un supresor multicopia de *hal4 hal5*. Hemos observado que Npr1 rescata los fenotipos en cuanto a estabilidad de permeasas (mayor sensibilidad a AZC y L-canavanina), pero no en cuanto al sistema de transporte de potasio de Trk1 (sensibilidad a LiCl e inviable con un suplemento de KCl menor a 2.5 mM). Además, hemos observado que la sobreexpresión de *NPR1* mejora la acumulación de Mup1-GFP en la membrana plasmática en medio con y sin suplemento de potasio (aunque sigue observándose GFP vacuolar en ambas condiciones). Por otro lado, los análisis de expresión demuestran que los niveles de Trk1 en la fracción insoluble son menores. Por tanto, el efecto de la sobreexpresión de *NPR1* en una cepa *hal4 hal5* no afecta a todos los transportadores de la membrana plasmática por igual. Los resultados apuntan a que Npr1 regula negativamente al sistema de transporte de potasio Trk1-Trk2, aunque se necesitan más experimentos para confirmar este resultado.

El hecho de que los fenotipos de una cepa doble mutante *hal4 hal5* no son idénticos a una cepa mutante *npr1* sugiere que no todos los fenotipos del mutante *hal4 hal5* se pueden explicar por sus menores niveles de expresión de Npr1. Aunque estos mutantes poseen fenotipos similares en cuanto a inestabilidad de algunos

transportadores de la membrana plasmática, ambas cepas difieren en su comportamiento con respecto a compuestos como sales, rapamicina o L-Canavanina. Mientras que el mutante *npr1* es tolerante o presenta un fenotipo silvestre a rapamicina, LiCl o al análogo tóxico de la arginina, la cepa *hal4 hal5* es sensible, o no tan tolerante, a estos mismos compuestos (datos no mostrados). Estos datos indican que no todos los transportadores de la membrana plasmática se regulan igual en ambas cepas y que las cepas *hal4 hal5* presentan defectos adicionales independientes de *Npr1*. Sin embargo, el conjunto de todos estos resultados encaja con el papel descrito para la quinasa *Npr1* que en su estado activo (desfosforilado) inhibe (al menos) algunos adaptadores de la ubiquitina ligasa, *Rsp5* (MacGurn et al., 2011). Por ejemplo, la mayor estabilidad de *Mup1* observada por la sobreexpresión de *NPR1* en una cepa *hal4 hal5* podría explicarse por el hecho de que aumentar los niveles de expresión mejoraría su tasa de actividad y favorecería la inhibición de *Art1* (y posiblemente otros ARTs), explicando la reducción en la degradación de *Mup1* observada en esta cepa. Ya hemos comentado que una característica de la familia ARTs es la redundancia de función y también que *Npr1* regula varios miembros más de esta familia así como otros adaptadores como *Bul1* y *Bul2* (Lin et al., 2008; Nikko and Pelham, 2009; MacGurn et al. 2011; O'Donnell et al., 2010; Merhi and Andre, 2012). En este trabajo también hemos observado que *Npr1* interacciona por doble híbrido con *Art3*, *Art6*, *Art8* y *Art9*, sugiriendo que el papel de *Npr1* sobre los ARTs podría ser más amplio (datos no mostrados). De hecho, nuestros datos indican que *Npr1* forma un complejo muy estable con *Art3* en todas las condiciones testadas. Por tanto, es posible que fenotípicamente la ausencia de *Npr1* no sea igual a cuando *Npr1* está presente pero hiperfosforilado, posiblemente explicando porque un mutante *hal4 hal5* no es idéntico a un mutante *npr1*.

Como resumen de la primera parte de la discusión planteamos un modelo en el que las quinasa *Hal4* y *Hal5* regulan positivamente *Npr1*. Los cambios en la acumulación y/o actividad de la quinasa *Npr1* producen una alteración del perfil de permeasas de la membrana plasmática a través de la regulación de la familia de adaptadores ARTs de manera que se favorece la estabilidad de algunas y la degradación vacuolar de otras.



Modelo de la regulación positiva de Npr1 por Hal4 y Hal5. Los datos en conjunto indican que de los dos defectos que presenta la cepa *hal4 hal5* con respecto a la toma de potasio y a la toma de aminoácidos, la sobreexpresión de *NPR1* sólo rescata el segundo. Esta sobreexpresión restaura los niveles de expresión a una cepa silvestre permitiendo la estabilización de las permeasas de la membrana plasmática como se indica en el modelo. El mecanismo por el cual las quinasas Hal4 y Hal5 regulan Npr1 se desconoce (aunque no parece directo; en ausencia de *HAL4* y *HAL5*, Npr1 está fosforilado), pero este podría implicar al complejo de fosfatasa Tap42-Sit4.

Hemos observado también que la cepa *hal4 hal5* muestra acumulación vacuolar de al menos Mup1 en condiciones de suplemento de potasio. Esta no puede ser prevenida por la adición de la Latrunculina A ni por la sobreexpresión de *NPR1* (en el caso de Mup1) sugiriendo que la vía secretora o la vía Vps también podrían estar alteradas en estas cepas. Esta segunda posibilidad encaja además con otro resultado obtenido en este trabajo en el que la acumulación en la membrana plasmática de Mup1 en condiciones de ayuno de metionina (induce la llegada de Mup1 a la membrana plasmática) es defectuosa en una cepa *hal4 hal5*. Las quinasas Hal4 y Hal5 podrían tener un papel en la vía secretora dependiente e independiente de la regulación de Npr1. No podemos descartar tampoco la posibilidad de que el fenotipo observado de estabilización de Mup1 en la membrana plasmática por la sobreexpresión de *NPR1* en una cepa *hal4 hal5* sea debido a un mayor reciclaje desde el Golgi hacia la membrana (y no sólo a una inhibición de la endocitosis). Npr1 ha sido descrito por regular el tráfico hacia la membrana plasmática de transportadores a través de los miembros Art3 y Art6, sin embargo en el caso del adaptador Art1 su papel sólo ha sido descrito en la endocitosis (O'Donnell et al., 2010; Lin et al., 2008).

La regulación del tráfico de los transportadores supone complejos mecanismos en los que participan muchas proteínas de distinta índole, con funciones similares que pueden solaparse o con funciones duales en el tráfico. Estos datos ponen de manifiesto que aunque hemos caracterizado a las quinasas Hal4 y Hal5 como reguladores positivos de la quinasa Npr1, se necesita más investigación para caracterizar sus efectos sobre las permeasas así como para desentrañar los mecanismos moleculares que gobiernan dicha regulación. Sin embargo, estamos en el

buen camino ya que hemos adquirido suficiente conocimiento y poseemos las herramientas necesarias para profundizar en esta investigación.

En la segunda parte de este trabajo, identificamos que la ruta TOR responde a cambios en los niveles internos de potasio. El estudio de algunas proteínas como Npr1, Sch9 o Atg8, proteínas marcadoras de alteraciones en la actividad de la ruta TORC1, ha permitido establecer dicha relación entre el complejo TOR1 y el KCl. Hemos observado que en una cepa silvestre la proteína Npr1 está hiperfosforilada y por tanto inactiva en condiciones de ayuno de KCl. También hemos observado una hiperfosforilación (activación) de la quinasa Sch9 en condiciones de ayuno de KCl. Es importante destacar que el efecto activador sobre el complejo TOR1 de los bajos niveles de potasio contrasta con la respuesta a ayuno de otros nutrientes como el nitrógeno o el fósforo. En estos casos, un ayuno inhibe este complejo señalizador. Por tanto, tenemos que seguir caracterizando esta ruta de señalización para esclarecer el sentido fisiológico de esta respuesta.

Podemos afirmar que aunque a nivel bioquímico se ha observado que las condiciones de bajo potasio producen alteraciones en algunos efectores de la ruta TOR y específicamente del complejo TORC1 (Sch9, Npr1 y ausencia de autofagia), a nivel fisiológico no se observan alteraciones (tolerancia/sensibilidad a litio y crecimiento en bajo potasio) en los mutantes de los componente de la ruta TOR, salvo el mutante *tco89*. El mutante *tco89* del complejo TORC1 muestra sensibilidad a Li^+ así como una disminución en su tasa de crecimiento, sin embargo descartamos que estos efectos sean debidos a una menor actividad del sistema de potasio Trk.

Otra proteína interesante que responde a la señalización mediada por la ruta TORC1, es el factor de transcripción Gln3. Como ya se ha mencionado en la Introducción, en condiciones en las que TOR está activado, Gln3 permanece en el citosol en complejo con Ure2, mientras que en condiciones que inactivan TORC1, Gln3 se disocia del complejo por desfosforilación y se transloca al núcleo para ejercer su función (Beck and Hall, 1999). En la literatura viene descrito que en mutantes *hal4* o *hal5*, la translocación de Gln3 al núcleo se ve disminuida con un tratamiento de cafeína (inactivación de TORC1), mientras que en mutantes *ppz1*, Gln3 se localiza constitutivamente en el núcleo, con independencia del tratamiento (Hirasaki et al., 2011). Los autores de esta publicación justifican dichos fenotipos por un efecto directo de las quinasas o la fosfatasa en los niveles de fosforilación de Gln3. En este trabajo de tesis postulamos que la deslocalización de Gln3 observada en una cepa carente de las quinasas Hal4 o Hal5 es debida a las bajas concentraciones intracelulares de KCl (mantienen a TORC1 activo), mientras que la localización nuclear de Gln3 en un mutante *ppz1* es debida a sus altos niveles intracelulares de K^+ (Yenush et al., 2005) que inactivarían TORC1. En este trabajo también hemos observado que células

crecidas hasta fase logarítmica en bajo potasio y tratadas con concentraciones superiores de KCl presentan un menor estado de fosforilación de Sch9, indicando que una mayor concentración de potasio inactiva TORC1 (datos no mostrados). Además, este efecto es independiente de su efecto osmótico. También, aunque los datos no son concluyentes, hemos observado que los niveles de fosforilación de Sch9 en un mutante *ppz1* son inferiores a los de una cepa silvestre, apoyando nuestra hipótesis. En un futuro pretendemos analizar la localización subcelular del factor de transcripción Gln3 en diferentes mutantes que presenten diferencias en sus niveles intracelulares de potasio o sodio. Otro dato que valida nuestra hipótesis es la localización citoplasmática que presenta Gln3 bajo condiciones de estrés salino (Masuda et al., 2000; Tate and Cooper, 2007). Uno de los efectos del estrés por sodio es la disminución de la concentración intracelular de potasio, lo cual apoyaría nuestra hipótesis.

A nivel de TORC2, descartamos que exista un efecto de los bajos niveles intracelulares de KCl en la fosforilación mediada por esta quinasa del sustrato Ypk1 en la treonina 662 (al menos a 30 minutos de tratamiento). Aunque en cepas carentes de las quinasas Hal4 y Hal5 y los transportadores Trk1 y Trk2 se observa una hipofosforilación de la quinasa Ypk1 en esta posición, esta hipofosforilación no se observa en una cepa silvestre ayunada para potasio. Tampoco se han observado alteraciones en la fosforilación de Ypk1 en una cepa mutante *ppz1* (datos no mostrados). Por lo tanto, nuestros datos sugieren dos posibilidades. La primera es que se necesitan tiempos mayores de ayuno de potasio para observar el mismo efecto de hipofosforilación de Ypk1 en una cepa silvestre, ya que los mayores efectos del ayuno de potasio se observan a 60 minutos de tratamiento (Barreto et al., 2012). La segunda posibilidad sería que la ausencia de las quinasas Hal4 y Hal5 y el sistema de transporte de potasio Trk1-Trk2 posean un fenotipo común, independiente de los niveles de potasio, relacionado con TORC2 (que reducirían su actividad). Planteamos analizar si los defectos en la fosforilación de Ypk1 (hipofosforilación) son debidos a una baja actividad de TORC2 a través del análisis del efecto del alelo de ganancia de función *YPK1^{D242A}*. Este versión constitutivamente hiperactiva posee una mutación en la región inhibitoria N-terminal que la convierte en independiente a la actividad de TOR, y debe ser capaz de rescatar los fenotipos de estas cepas debidos específicamente a defectos en la función de TORC2 (Kamada et al., 2005; Roelants et al., 2011).

La quinasa Ypk1, se ha relacionado con los procesos celulares de endocitosis y biosíntesis de esfingolípidos (deHart et al., 2002; Aronova et al., 2008). Dado que el fenotipo en términos de endocitosis del mutante *ypk1* es opuesto (defecto en la internalización del factor α) al de las cepas *hal4 hal5* y *trk1 trk2* (incremento en la endocitosis y acumulación vacuolar de transportadores), descartamos que el efecto en la endocitosis en estas cepas sea debido a un defecto en la actividad de Ypk1 (deHart et al., 2002).

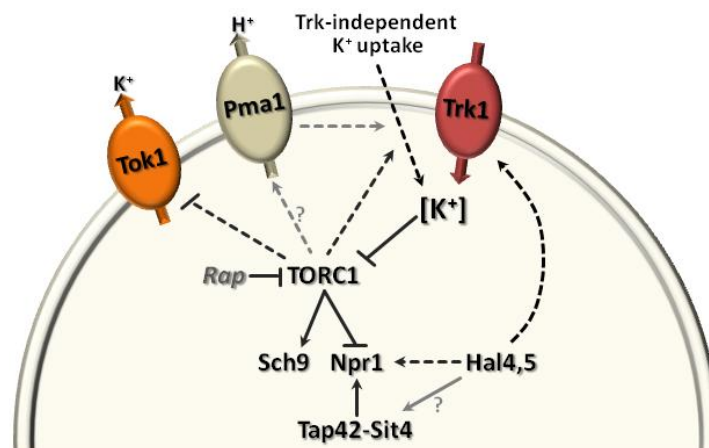
Por otro lado, TORC2 mantiene el crecimiento celular a través del control de la biosíntesis de esfingolípidos (Aronova et al., 2008). Bajos niveles de esfingolípidos activan TORC2 que a su vez activan Ypk1. La activación de esta quinasa produce la fosfoinhibición de las proteínas Orm, permitiendo la síntesis de esfingolípidos. Por lo tanto, cepas con menores niveles de actividad de Ypk1 tendrían una reducción en la fosfoinhibición de las proteínas Orm (quienes inhiben la biosíntesis de esfingolípidos). Este escenario provocaría una reducción en los niveles de esfingolípidos que se reflejaría en una mayor sensibilidad a la droga miriocina (*Myriocin*), inhibidora del primer paso de la síntesis de esfingolípidos. Planteamos analizar el fenotipo a la droga miriocina de las cepas *hal4 hal5* y *trk1 trk2*, ya que un fenotipo de sensibilidad a miriocina implicaría un defecto en la inducción de la biosíntesis de esfingolípidos que podría estar relacionado con su baja actividad de Ypk1.

Recientemente se ha propuesto que TORC1 controla la fosforilación de las proteínas Orm y la síntesis de esfingolípidos vía un mecanismo diferente al de TORC2 (Shimobayasi et al., 2013). TORC1 media la fosforilación de las proteínas Orm activándolas y promoviendo la síntesis *de novo* de esfingolípidos. Específicamente, en presencia de rapamicina o ayuno de nutrientes, Npr1 se activa y fosforila las proteínas Orm que promueven la síntesis de esfingolípidos. En este contexto, la cepa *hal4 hal5* que presenta bajos niveles de fosforilación de Ypk1 y altos niveles de fosforilación de Npr1, debe presentar una baja tasa de biosíntesis de esfingolípidos por dos mecanismos distintos. Por un lado, Ypk1 menos fosforilado (menos activo), es deficiente en la fosfoinhibición de las proteínas Orm en su papel en la inhibición del primer paso de la biosíntesis de esfingolípidos y por otro lado, Npr1 inactivo (fosforilado), no puede fosfoactivar las proteínas Orm. Además mutantes en los sitios de fosforilación dependientes de TORC1 de Orm1 y Orm2 presentan un fenotipo similar a una cepa *hal4 hal5* en cuanto al defecto en la acumulación de Gap1 en la membrana plasmática en medio con urea (Shimobayashi et al., 2013; Perez-Valle et al., 2007). La explicación de estos autores a este fenotipo es que los reducidos niveles de esfingolípidos son necesarios para el tráfico de Gap1 hacia la membrana. Sin embargo, cabe destacar que existe discrepancia en la literatura acerca de si dicha alteración de esfingolípidos posee un efecto sobre el tráfico de todos los transportadores de la membrana plasmática (Grossmann et al., 2008; Brach et al., 2011). No obstante, sería interesante analizar el contenido en esfingolípidos, así como los niveles de expresión y/o fosforilación de las proteínas Orm en una cepa *hal4 hal5*.

Por último, sí hemos sido capaces de establecer que los mutantes con concentraciones intracelulares de potasio bajas son sensibles a rapamicina. Nuestros datos indican que dicha sensibilidad a rapamicina es debida a una disminución en el contenido intracelular de potasio inducida por ésta. Además, dicho efecto es dependiente de TORC1 ya que no se observa en el mutante *fpr1* y es independiente del sistema de

toma de potasio Trk1-Trk2, puesto que se observa el mismo efecto en una cepa silvestre y en una cepa *trk1 trk2*. Descartamos también que la sensibilidad a rapamicina de estas cepas pudiera ser debida a la baja actividad de Pma1 ya que hemos observado que mutantes con una actividad de Pma1 reducida como *ptk2* o *brp1* son ligeramente tolerantes a la rapamicina (datos no mostrados). Sin embargo, necesitamos realizar más experimentos con el fin de caracterizar el mecanismo por el cual la rapamicina afecta al contenido de potasio intracelular. Experimentos con mutantes para el principal canal de salida de potasio *tok1* (prevendrían la salida), podrían resolver el enigma de si la rapamicina afecta a la toma o la extrusión del potasio. Sin embargo, el hecho de que cepas con defectos en la toma de potasio sean hipersensibles a rapamicina podría sugerir que la rapamicina actúa sobre la toma de potasio.

Con el conjunto de datos obtenidos, proponemos un modelo tentativo sobre la relación recíproca entre el potasio y la ruta de señalización mediado por TORC1. Observamos por un lado que bajas concentraciones internas de potasio activan la ruta TORC1 (fosforilación de Sch9 y Npr1) y por otro lado que la inhibición de TORC1 disminuye la acumulación interna de potasio. Este último efecto podría producirse a través de sistemas de toma o extrusión de potasio (por Tok1, por ejemplo) o por la inactivación de Pma1 lo cual alteraría el potencial de membrana y podría impedir la entrada de potasio.



Modelo de la regulación recíproca entre la ruta TORC1 y el potasio. Los datos en conjunto indican que bajos niveles de potasio intracelular producen la activación de TORC1, indicado por la fosforilación de las quinasas Sch9 y Npr1. Por otro lado, la inactivación de TORC1 por rapamicina supone la inhibición de los sistemas de toma de potasio independientes a Trk1 o la activación del sistema de extrusión de potasio (Tok1), que disminuyen el contenido de potasio interno. Esta disminución del contenido de potasio intracelular podría ser debida a alteraciones en la actividad de Pma1 de manera directa o indirecta.

Los resultados presentados a lo largo de este trabajo demuestran un papel novedoso de la ruta TOR en la regulación de la concentración del potasio, un catión altamente representado y regulado en el interior celular. La regulación de la concentración del potasio por esta ruta fundamental en el crecimiento celular, pone de manifiesto la importancia de este catión para la vida y abre nuevos campos en la investigación de los sofisticados mecanismos que regulan el mantenimiento de su homeostasis. El hecho de que este mecanismo esté muy conservado en organismos eucariotas añade importancia a esta búsqueda de conocimiento. Nuestros resultados también indican la importancia de las quinasas Hal4 y Hal5 en la regulación de diferentes vías esenciales para la supervivencia celular como la endocitosis, el tráfico a la membrana o la ruta de regulación del crecimiento celular TOR a través de sus dos complejos, probablemente en su papel general en la regulación de la homeostasis de iones.

Conclusiones

1. El análisis transcriptómico de una cepa mutante *hal4 hal5* reveló que la ausencia de estos genes origina alteraciones generales en el metabolismo de aminoácidos y de glucosa, datos que confirmamos mediante la medida de la activación de la ruta Gcn4, de la toma de metionina y de leucina, de la actividad de la succinato deshidrogenasa (SDH), del consumo de glucosa y de la producción de etanol de este mutante.
2. Las quinasas Hal4 y Hal5 son necesarias para inhibir la endocitosis y posterior degradación vacuolar de permeasas de la membrana plasmática (como Mup1) como demuestran los resultados obtenidos con el inhibidor de la endocitosis Latrunculina A, así como experimentos con versiones mutantes de Rsp5. Se ha demostrado un papel adicional al descrito para la α -arrestina de la familia ARTs, Art1.
3. En condiciones de ayuno de metionina, el mutante *hal4 hal5* presenta un defecto en la acumulación de Mup1 en la membrana plasmática. Ello sugiere que las quinasas Hal4 y Hal5 también están implicadas en la regulación de la llegada y/o el reciclaje de Mup1 hacia la membrana plasmática, apoyando el fenotipo de ayuno de metionina observado.
4. Hemos identificado que la estabilidad en la membrana plasmática del transportador Dip5 en un mutante *hal4 hal5* está alterada en condiciones de potasio limitante, indicando que la inestabilidad de las permeasas observada en este mutante viene mediada por diferentes miembros de la familia ARTs. Sin embargo, el fenotipo observado para Dip5 sugiere que las quinasas pueden afectar al tráfico de diferentes maneras o en diferentes puntos del tránsito desde la membrana a la vacuola.
5. Las quinasas Hal4 y Hal5 regulan positivamente a la quinasa Npr1 como indican los menores niveles de expresión y de actividad de Npr1, así como el hecho de que *NPR1* es un supresor multicopia de los fenotipos relacionados con la toma de aminoácidos del mutante *hal4 hal5*. Esta regulación es consistente con la acumulación vacuolar de permeasas de aminoácidos, como Mup1, observada en un mutante *hal4 hal5*, ya que Npr1 regula negativamente las proteínas de la familia ARTs necesarias para la ubiquitinación de estas permeasas. Alteraciones en la ruta mediada por TORC1 aguas arriba de Npr1 no modulan el fenotipo del mutante *hal4 hal5*.

6. En presencia de concentraciones limitantes de KCl, se observa un incremento en los niveles de fosforilación de los sustratos directos del complejo TORC1, las quinasas Sch9 y Npr1. Aunque no se observan efectos fisiológicos a nivel de crecimiento celular en los mutantes analizados, nuestros datos sugieren que a nivel bioquímico al menos unas ramas de señalización de la ruta TORC1 responden a potasio, como a muchos otros nutrientes como el nitrógeno o el fósforo.

7. Los mutantes *hal4 hal5* y *trk1 trk2* presentan bajos niveles de fosforilación del sustrato directo del complejo TORC2, la quinasa Ypk1, lo que indica una posible reducción en la actividad de TORC2 con independencia de los niveles intracelulares de potasio. Se requieren más estudios para definir el mecanismo molecular y determinar su impacto a nivel fisiológico.

8. El tratamiento con rapamicina disminuye los niveles de potasio intracelular mediante un mecanismo dependiente de TORC1 e independiente de Trk1, explicando la sensibilidad de los mutantes *hal4 hal5* y *trk1 trk2* a rapamicina y su rescate por adición de potasio en el medio. Estas observaciones indican que TORC1 regula la homeostasis de potasio, y aunque el mecanismo molecular está todavía por definir, nuestros datos revelan una función novedosa para esta ruta.

Bibliografía

- Abe, F., and H. Iida, 2003, Pressure-induced differential regulation of the two tryptophan permeases Tat1 and Tat2 by ubiquitin ligase Rsp5 and its binding proteins, Bul1 and Bul2: *Mol Cell Biol*, v. 23, p. 7566-84.
- Abriel, H., J. Löffing, J. F. Rebhun, J. H. Pratt, L. Schild, J. D. Horisberger, D. Rotin, and O. Staub, 1999, Defective regulation of the epithelial Na⁺ channel by Nedd4 in Liddle's syndrome: *J Clin Invest*, v. 103, p. 667-73.
- Albuquerque, C. P., M. B. Smolka, S. H. Payne, V. Bafna, J. Eng, and H. Zhou, 2008, A multidimensional chromatography technology for in-depth phosphoproteome analysis: *Mol Cell Proteomics*, v. 7, p. 1389-96.
- Alvarez, C. E., 2008, On the origins of arrestin and rhodopsin: *BMC Evol Biol*, v. 8, p. 222.
- Alvaro, C. G., A. F. O'Donnell, D. C. Prosser, A. A. Augustine, A. Goldman, J. L. Brodsky, M. S. Cyert, B. Wendland, and J. Thorner, 2014, Specific α -arrestins negatively regulate *Saccharomyces cerevisiae* pheromone response by down-modulating the G-protein-coupled receptor Ste2: *Mol Cell Biol*, v. 34, p. 2660-81.
- Andréasson, C., E. P. Neve, and P. O. Ljungdahl, 2004, Four permeases import proline and the toxic proline analogue azetidine-2-carboxylate into yeast: *Yeast*, v. 21, p. 193-9.
- Arino, J., J. Ramos, and H. Sychrova, 2010, Alkali Metal Cation Transport and Homeostasis in Yeasts: *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, v. 74, p. 95-+.
- Arnason, T. G., M. G. Piscelevich, M. D. Dash, G. F. Davies, and T. A. Harkness, 2005, Novel interaction between Apc5p and Rsp5p in an intracellular signaling pathway in *Saccharomyces cerevisiae*: *Eukaryot Cell*, v. 4, p. 134-46.
- Aronova, S., K. Wedaman, P. A. Aronov, K. Fontes, K. Ramos, B. D. Hammock, and T. Powers, 2008, Regulation of ceramide biosynthesis by TOR complex 2: *Cell Metab*, v. 7, p. 148-58.
- Audhya, A., R. Loewith, A. B. Parsons, L. Gao, M. Tabuchi, H. Zhou, C. Boone, M. N. Hall, and S. D. Emr, 2004, Genome-wide lethality screen identifies new PI4,5P2 effectors that regulate the actin cytoskeleton: *EMBO J*, v. 23, p. 3747-57.
- Ayscough, K. R., J. Stryker, N. Pokala, M. Sanders, P. Crews, and D. G. Drubin, 1997, High rates of actin filament turnover in budding yeast and roles for actin in establishment and maintenance of cell polarity revealed using the actin inhibitor latrunculin-A: *J Cell Biol*, v. 137, p. 399-416.
- Baggett, J. J., and B. Wendland, 2001, Clathrin function in yeast endocytosis: *Traffic*, v. 2, p. 297-302.
- Bagnat, M., A. Chang, and K. Simons, 2001, Plasma membrane proton ATPase Pma1p requires raft association for surface delivery in yeast: *Molecular Biology of the Cell*, v. 12, p. 4129-4138.
- Bagnat, M., S. Keränen, A. Shevchenko, and K. Simons, 2000, Lipid rafts function in biosynthetic delivery of proteins to the cell surface in yeast: *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 97, p. 3254-9.
- Barbet, N. C., U. Schneider, S. B. Helliwell, I. Stansfield, M. F. Tuite, and M. N. Hall, 1996, TOR controls translation initiation and early G1 progression in yeast: *Mol Biol Cell*, v. 7, p. 25-42.
- Barreto, L., D. Canadell, S. Petrezselyova, C. Navarrete, L. Maresova, J. Perez-Valle, R. Herrera, I. Olier, J. Giraldo, H. Sychrova, L. Yenush, J. Ramos, and J. Arino, 2011, A Genomewide Screen for Tolerance to Cationic Drugs Reveals Genes Important for Potassium Homeostasis in *Saccharomyces cerevisiae*: *Eukaryotic Cell*, v. 10, p. 1241-1250.
- Barreto, L., D. Canadell, D. Valverde-Saubí, A. Casamayor, and J. Ariño, 2012, The short-term response of yeast to potassium starvation: *Environ Microbiol*, v. 14, p. 3026-42.
- Bañuelos, M. A., H. Sychrová, C. Bleykasten-Grosshans, J. L. Souciet, and S. Potier, 1998, The Nha1 antiporter of *Saccharomyces cerevisiae* mediates sodium and potassium efflux: *Microbiology*, v. 144 (Pt 10), p. 2749-58.

- Beaudenon, S. L., M. R. Huacani, G. Wang, D. P. McDonnell, and J. M. Huibregtse, 1999, Rsp5 ubiquitin-protein ligase mediates DNA damage-induced degradation of the large subunit of RNA polymerase II in *Saccharomyces cerevisiae*: *Mol Cell Biol*, v. 19, p. 6972-9.
- Beck, T., and M. N. Hall, 1999, The TOR signalling pathway controls nuclear localization of nutrient-regulated transcription factors: *Nature*, v. 402, p. 689-92.
- Beck, T., A. Schmidt, and M. N. Hall, 1999, Starvation induces vacuolar targeting and degradation of the tryptophan permease in yeast: *J Cell Biol*, v. 146, p. 1227-38.
- Becuwe, M., and S. Léon, 2014, Integrated control of transporter endocytosis and recycling by the arrestin-related protein Rod1 and the ubiquitin ligase Rsp5: *Elife*, v. 3.
- Becuwe, M., N. Vieira, D. Lara, J. Gomes-Rezende, C. Soares-Cunha, M. Casal, R. Haguenaer-Tsapis, O. Vincent, S. Paiva, and S. Leon, 2012, A molecular switch on an arrestin-like protein relays glucose signaling to transporter endocytosis: *Journal of Cell Biology*, v. 196, p. 247-259.
- Belgareh-Touzé, N., S. Léon, Z. Erpapazoglou, M. Stawiecka-Mirota, D. Urban-Grimal, and R. Haguenaer-Tsapis, 2008, Versatile role of the yeast ubiquitin ligase Rsp5p in intracellular trafficking: *Biochem Soc Trans*, v. 36, p. 791-6.
- Berchtold, D., M. Piccolis, N. Chiaruttini, I. Riezman, H. Riezman, A. Roux, T. C. Walther, and R. Loewith, 2012, Plasma membrane stress induces relocalization of Slm proteins and activation of TORC2 to promote sphingolipid synthesis: *Nat Cell Biol*, v. 14, p. 542-7.
- Berchtold, D., and T. C. Walther, 2009, TORC2 plasma membrane localization is essential for cell viability and restricted to a distinct domain: *Mol Biol Cell*, v. 20, p. 1565-75.
- Binda, M., M. P. Péli-Gulli, G. Bonfils, N. Panchaud, J. Urban, T. W. Sturgill, R. Loewith, and C. De Virgilio, 2009, The Vam6 GEF controls TORC1 by activating the EGO complex: *Mol Cell*, v. 35, p. 563-73.
- Boles, E., and C. P. Hollenberg, 1997, The molecular genetics of hexose transport in yeasts: *FEMS Microbiol Rev*, v. 21, p. 85-111.
- Brach, T., T. Specht, and M. Kaksonen, 2011, Reassessment of the role of plasma membrane domains in the regulation of vesicular traffic in yeast: *J Cell Sci*, v. 124, p. 328-37.
- Breitkreutz, A., H. Choi, J. R. Sharom, L. Boucher, V. Neduva, B. Larsen, Z. Y. Lin, B. J. Breitkreutz, C. Stark, G. Liu, J. Ahn, D. Dewar-Darch, T. Reguly, X. Tang, R. Almeida, Z. S. Qin, T. Pawson, A. C. Gingras, A. I. Nesvizhskii, and M. Tyers, 2010, A global protein kinase and phosphatase interaction network in yeast: *Science*, v. 328, p. 1043-6.
- Broach, J. R., 2012, Nutritional control of growth and development in yeast: *Genetics*, v. 192, p. 73-105.
- Brohée, S., R. Barriot, Y. Moreau, and B. André, 2010, YTPdb: a wiki database of yeast membrane transporters: *Biochim Biophys Acta*, v. 1798, p. 1908-12.
- Bultynck, G., V. L. Heath, A. P. Majeed, J. M. Galan, R. Haguenaer-Tsapis, and M. S. Cyert, 2006, Slm1 and slm2 are novel substrates of the calcineurin phosphatase required for heat stress-induced endocytosis of the yeast uracil permease: *Mol Cell Biol*, v. 26, p. 4729-45.
- Burchett, S. A., A. Scott, B. Errede, and H. G. Dohlman, 2001, Identification of novel pheromone-response regulators through systematic overexpression of 120 protein kinases in yeast: *J Biol Chem*, v. 276, p. 26472-8.
- Cafferkey, R., P. R. Young, M. M. McLaughlin, D. J. Bergsma, Y. Koltin, G. M. Sathe, L. Faucette, W. K. Eng, R. K. Johnson, and G. P. Livi, 1993, Dominant missense mutations in a novel yeast protein related to mammalian phosphatidylinositol 3-kinase and VPS34 abrogate rapamycin cytotoxicity: *Mol Cell Biol*, v. 13, p. 6012-23.
- Canadell, D., A. González, C. Casado, and J. Ariño, 2015, Functional interactions between potassium and phosphate homeostasis in *Saccharomyces cerevisiae*: *Mol Microbiol*, v. 95, p. 555-72.

- Cardenas, M. E., N. S. Cutler, M. C. Lorenz, C. J. Di Como, and J. Heitman, 1999, The TOR signaling cascade regulates gene expression in response to nutrients: *Genes Dev*, v. 13, p. 3271-9.
- Casado, C., L. Yenush, C. Melero, M. del Carmen Ruiz, R. Serrano, J. Perez-Valle, J. Arino, and J. Ramos, 2010, Regulation of Trk-dependent potassium transport by the calcineurin pathway involves the Hal5 kinase: *Febs Letters*, v. 584, p. 2415-2420.
- Casamayor, A., P. D. Torrance, T. Kobayashi, J. Thorner, and D. R. Alessi, 1999, Functional counterparts of mammalian protein kinases PDK1 and SGK in budding yeast: *Curr Biol*, v. 9, p. 186-97.
- Chen, J., X. F. Zheng, E. J. Brown, and S. L. Schreiber, 1995, Identification of an 11-kDa FKBP12-rapamycin-binding domain within the 289-kDa FKBP12-rapamycin-associated protein and characterization of a critical serine residue: *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 92, p. 4947-51.
- Chen, Y., and D. J. Klionsky, 2011, The regulation of autophagy - unanswered questions: *J Cell Sci*, v. 124, p. 161-70.
- Choi, J., J. Chen, S. L. Schreiber, and J. Clardy, 1996, Structure of the FKBP12-rapamycin complex interacting with the binding domain of human FRAP: *Science*, v. 273, p. 239-42.
- Cohen, A., and M. N. Hall, 2009, An amino acid shuffle activates mTORC1: *Cell*, v. 136, p. 399-400.
- Conibear, E., 2010, Converging views of endocytosis in yeast and mammals: *Curr Opin Cell Biol*, v. 22, p. 513-8.
- Crespo, J. L., K. Daicho, T. Ushimaru, and M. N. Hall, 2001, The GATA transcription factors GLN3 and GAT1 link TOR to salt stress in *Saccharomyces cerevisiae*: *Journal of Biological Chemistry*, v. 276, p. 34441-34444.
- Crespo, J. L., and M. N. Hall, 2002, Elucidating TOR signaling and rapamycin action: lessons from *Saccharomyces cerevisiae*: *Microbiol Mol Biol Rev*, v. 66, p. 579-91, table of contents.
- Crespo, J. L., T. Powers, B. Fowler, and M. N. Hall, 2002, The TOR-controlled transcription activators GLN3, RTG1, and RTG3 are regulated in response to intracellular levels of glutamine: *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 99, p. 6784-9.
- Cullen, P. J., 2011, Phosphoinositides and the regulation of tubular-based endosomal sorting: *Biochem Soc Trans*, v. 39, p. 839-50.
- Curto, M., L. Valledor, C. Navarrete, D. Gutiérrez, H. Sychrova, J. Ramos, and J. Jorin, 2010, 2-DE based proteomic analysis of *Saccharomyces cerevisiae* wild and K⁺ transport-affected mutant (*trk1,2*) strains at the growth exponential and stationary phases: *J Proteomics*, v. 73, p. 2316-35.
- D'Hondt, K., A. Heese-Peck, and H. Riezman, 2000, Protein and lipid requirements for endocytosis: *Annu Rev Genet*, v. 34, p. 255-295.
- De Craene, J. O., O. Soetens, and B. Andre, 2001, The Npr1 kinase controls biosynthetic and endocytic sorting of the yeast Gap1 permease: *J Biol Chem*, v. 276, p. 43939-48.
- de Nadal, E., J. Clotet, F. Posas, R. Serrano, N. Gomez, and J. Ariño, 1998, The yeast halotolerance determinant Hal3p is an inhibitory subunit of the Ppz1p Ser/Thr protein phosphatase: *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 95, p. 7357-62.
- De Virgilio, C., and R. Loewith, 2006, Cell growth control: little eukaryotes make big contributions: *Oncogene*, v. 25, p. 6392-415.
- deHart, A. K., J. D. Schnell, D. A. Allen, and L. Hicke, 2002, The conserved Pkh-Ypk kinase cascade is required for endocytosis in yeast: *J Cell Biol*, v. 156, p. 241-8.
- deHart, A. K., J. D. Schnell, D. A. Allen, J. Y. Tsai, and L. Hicke, 2003, Receptor internalization in yeast requires the Tor2-Rho1 signaling pathway: *Mol Biol Cell*, v. 14, p. 4676-84.
- Di Como, C. J., and K. T. Arndt, 1996, Nutrients, via the Tor proteins, stimulate the association of Tap42 with type 2A phosphatases: *Genes Dev*, v. 10, p. 1904-16.

- Duncan, L. M., S. Piper, R. B. Dodd, M. K. Saville, C. M. Sanderson, J. P. Luzio, and P. J. Lehner, 2006, Lysine-63-linked ubiquitination is required for endolysosomal degradation of class I molecules: *EMBO J*, v. 25, p. 1635-45.
- Durell, S. R., and H. R. Guy, 1999, Structural models of the KtrB, TrkH, and Trk1,2 symporters based on the structure of the KcsA K(+) channel: *Biophys J*, v. 77, p. 789-807.
- Düvel, K., A. Santhanam, S. Garrett, L. Schneper, and J. R. Broach, 2003, Multiple roles of Tap42 in mediating rapamycin-induced transcriptional changes in yeast: *Mol Cell*, v. 11, p. 1467-78.
- Eide, D. J., S. Clark, T. M. Nair, M. Gehl, M. Gribskov, M. L. Guerinot, and J. F. Harper, 2005, Characterization of the yeast ionome: a genome-wide analysis of nutrient mineral and trace element homeostasis in *Saccharomyces cerevisiae*: *Genome Biol*, v. 6, p. R77.
- Eraso, P., and C. Gancedo, 1987, Activation of yeast plasma membrane ATPase by acid pH during growth: *FEBS Lett*, v. 224, p. 187-92.
- Eraso, P., M. J. Mazón, and F. Portillo, 2006, Yeast protein kinase Ptk2 localizes at the plasma membrane and phosphorylates in vitro the C-terminal peptide of the H⁺-ATPase: *Biochim Biophys Acta*, v. 1758, p. 164-70.
- Fadri, M., A. Daquinag, S. Wang, T. Xue, and J. Kunz, 2005, The pleckstrin homology domain proteins Slm1 and Slm2 are required for actin cytoskeleton organization in yeast and bind phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate and TORC2: *Mol Biol Cell*, v. 16, p. 1883-900.
- Fasolo, J., A. Sboner, M. G. Sun, H. Yu, R. Chen, D. Sharon, P. M. Kim, M. Gerstein, and M. Snyder, 2011, Diverse protein kinase interactions identified by protein microarrays reveal novel connections between cellular processes: *Genes Dev*, v. 25, p. 767-78.
- Fernandes, A. R., and I. Sá-Correia, 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*, v. 20, p. 207-19.
- Feyder, S., J. O. De Craene, S. Bär, D. L. Bertazzi, and S. Friant, 2015, Membrane Trafficking in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae* Model: *Int J Mol Sci*, v. 16, p. 1509-1525.
- Fisk, H. A., and M. P. Yaffe, 1999, A role for ubiquitination in mitochondrial inheritance in *Saccharomyces cerevisiae*: *J Cell Biol*, v. 145, p. 1199-208.
- Forment, J., J. M. Mulet, O. Vicente, and R. Serrano, 2002, The yeast SR protein kinase Sky1p modulates salt tolerance, membrane potential and the Trk1,2 potassium transporter: *Biochim Biophys Acta*, v. 1565, p. 36-40.
- Gaber, R. F., C. A. Styles, and G. R. Fink, 1988, TRK1 encodes a plasma membrane protein required for high-affinity potassium transport in *Saccharomyces cerevisiae*: *Mol Cell Biol*, v. 8, p. 2848-59.
- Gajewska, B., N. Shcherbik, D. Oficjalska, D. S. Haines, and T. Zoladek, 2003, Functional analysis of the human orthologue of the RSP5-encoded ubiquitin protein ligase, hNedd4, in yeast: *Current Genetics*, v. 43, p. 1-10.
- Galan, J. M., V. Moreau, B. Andre, C. Volland, and R. HaguenaerTsapis, 1996, Ubiquitination mediated by the Npi1p/Rsp5p ubiquitin-protein ligase is required for endocytosis of the yeast uracil permease: *Journal of Biological Chemistry*, v. 271, p. 10946-10952.
- Galletta, B. J., and J. A. Cooper, 2009, Actin and endocytosis: mechanisms and phylogeny: *Curr Opin Cell Biol*, v. 21, p. 20-7.
- Gander, S., D. Martin, S. Hauri, S. Moes, G. Poletto, M. A. Pagano, O. Marin, F. Meggio, and P. Jenoe, 2009, A modified KESTREL search reveals a basophilic substrate consensus for the *Saccharomyces cerevisiae* Npr1 protein kinase: *J Proteome Res*, v. 8, p. 5305-16.
- Gelis, S., M. Curto, L. Valledor, A. González, J. Ariño, J. Jorrín, and J. Ramos, 2012, Adaptation to potassium starvation of wild-type and K(+)-transport mutant (trk1,2) of *Saccharomyces cerevisiae*: 2-dimensional gel electrophoresis-based proteomic approach: *Microbiologyopen*, v. 1, p. 182-93.

- Gey, U., C. Czupalla, B. Hoflack, U. Krause, and G. Rödel, 2014, Proteomic analysis reveals a novel function of the kinase Sat4p in *Saccharomyces cerevisiae* mitochondria: *PLoS One*, v. 9, p. e103956.
- Gits, J. J., and M. Grenson, 1967, Multiplicity of the amino acid permeases in *Saccharomyces cerevisiae*. 3. Evidence for a specific methionine-transporting system: *Biochim Biophys Acta*, v. 135, p. 507-16.
- Goffeau, A., B. G. Barrell, H. Bussey, R. W. Davis, B. Dujon, H. Feldmann, F. Galibert, J. D. Hoheisel, C. Jacq, M. Johnston, E. J. Louis, H. W. Mewes, Y. Murakami, P. Philippsen, H. Tettelin, and S. G. Oliver, 1996, Life with 6000 genes: *Science*, v. 274, p. 546, 563-7.
- Goffeau, A., and C. W. Slayman, 1981, The proton-translocating ATPase of the fungal plasma membrane: *Biochim Biophys Acta*, v. 639, p. 197-223.
- González, A., A. Ruiz, A. Casamayor, and J. Ariño, 2009, Normal function of the yeast TOR pathway requires the type 2C protein phosphatase Ptc1: *Mol Cell Biol*, v. 29, p. 2876-88.
- Goossens, A., N. de La Fuente, J. Forment, R. Serrano, and F. Portillo, 2000, Regulation of yeast H(+)-ATPase by protein kinases belonging to a family dedicated to activation of plasma membrane transporters: *Mol Cell Biol*, v. 20, p. 7654-61.
- Grenson, M., 1983, Inactivation-reactivation process and repression of permease formation regulate several ammonia-sensitive permeases in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: *Eur J Biochem*, v. 133, p. 135-9.
- Grenson, M., M. Mousset, J. M. Wiame, and J. Bechet, 1966, Multiplicity of the amino acid permeases in *Saccharomyces cerevisiae*. I. Evidence for a specific arginine-transporting system: *Biochim Biophys Acta*, v. 127, p. 325-38.
- Griffiths, G., and J. Gruenberg, 1991, The arguments for pre-existing early and late endosomes: *Trends Cell Biol*, v. 1, p. 5-9.
- Grossmann, G., J. Malinsky, W. Stahlschmidt, M. Loibl, I. Weig-Meckl, W. B. Frommer, M. Opekarová, and W. Tanner, 2008, Plasma membrane microdomains regulate turnover of transport proteins in yeast: *J Cell Biol*, v. 183, p. 1075-88.
- Guba, M., P. von Breitenbuch, M. Steinbauer, G. Koehl, S. Flegel, M. Hornung, C. J. Bruns, C. Zuelke, S. Farkas, M. Anthuber, K. W. Jauch, and E. K. Geissler, 2002, Rapamycin inhibits primary and metastatic tumor growth by antiangiogenesis: involvement of vascular endothelial growth factor: *Nat Med*, v. 8, p. 128-35.
- Gwizdek, C., M. Hobeika, B. Kus, B. Ossareh-Nazari, C. Dargemont, and M. S. Rodriguez, 2005, The mRNA nuclear export factor Hpr1 is regulated by Rsp5-mediated ubiquitylation: *J Biol Chem*, v. 280, p. 13401-5.
- Hall, M. N., 1996, The TOR signalling pathway and growth control in yeast: *Biochem Soc Trans*, v. 24, p. 234-9.
- Harkness, T. A., G. F. Davies, V. Ramaswamy, and T. G. Arnason, 2002, The ubiquitin-dependent targeting pathway in *Saccharomyces cerevisiae* plays a critical role in multiple chromatin assembly regulatory steps: *Genetics*, v. 162, p. 615-32.
- Hatakeyama, R., M. Kamiya, T. Takahara, and T. Maeda, 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*, v. 30, p. 5598-5607.
- Hein, C., J. Y. Springael, C. Volland, R. Haguenaer-Tsapis, and B. André, 1995a, NPI1, an essential yeast gene involved in induced degradation of Gap1 and Fur4 permeases, encodes the Rsp5 ubiquitin-protein ligase: *Mol Microbiol*, v. 18, p. 77-87.
- Hein, C., J. Y. Springael, C. Volland, R. Haguenaer-Tsapis, and B. André, 1995b, NPI1, AN ESSENTIAL YEAST GENE INVOLVED IN INDUCED DEGRADATION OF GAP1 AND FUR4 PERMEASES, ENCODES THE RSP5 UBIQUITIN-PROTEIN LIGASE: *Molecular Microbiology*, v. 18, p. 77-87.

- Heitman, J., N. R. Movva, and M. N. Hall, 1991a, Targets for cell cycle arrest by the immunosuppressant rapamycin in yeast: *Science*, v. 253, p. 905-9.
- Heitman, J., N. R. Movva, P. C. Hiestand, and M. N. Hall, 1991b, FK 506-binding protein proline rotamase is a target for the immunosuppressive agent FK 506 in *Saccharomyces cerevisiae*: *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 88, p. 1948-52.
- Helliwell, S. B., I. Howald, N. Barbet, and M. N. Hall, 1998a, TOR2 is part of two related signaling pathways coordinating cell growth in *Saccharomyces cerevisiae*: *Genetics*, v. 148, p. 99-112.
- Helliwell, S. B., A. Schmidt, Y. Ohya, and M. N. Hall, 1998b, The Rho1 effector Pkc1, but not Bni1, mediates signalling from Tor2 to the actin cytoskeleton: *Curr Biol*, v. 8, p. 1211-4.
- Helliwell, S. B., P. Wagner, J. Kunz, M. Deuter-Reinhard, R. Henriquez, and M. N. Hall, 1994, TOR1 and TOR2 are structurally and functionally similar but not identical phosphatidylinositol kinase homologues in yeast: *Mol Biol Cell*, v. 5, p. 105-18.
- Herrera, R., M. C. Álvarez, S. Gelis, and J. Ramos, 2013, Subcellular potassium and sodium distribution in *Saccharomyces cerevisiae* wild-type and vacuolar mutants: *Biochem J*, v. 454, p. 525-32.
- Hess, D. C., W. Lu, J. D. Rabinowitz, and D. Botstein, 2006, Ammonium toxicity and potassium limitation in yeast: *PLoS Biol*, v. 4, p. e351.
- Hettema, E. H., J. Valdez-Taubas, and H. R. B. Pelham, 2004, Bsd2 binds the ubiquitin ligase Rsp5 and mediates the ubiquitination of transmembrane proteins: *Embo Journal*, v. 23, p. 1279-1288.
- Hicke, L., 1997, Ubiquitin-dependent internalization and down-regulation of plasma membrane proteins: *FASEB J*, v. 11, p. 1215-26.
- Hicke, L., 2001, Protein regulation by monoubiquitin: *Nat Rev Mol Cell Biol*, v. 2, p. 195-201.
- Hicke, L., and H. Riezman, 1996, Ubiquitination of a yeast plasma membrane receptor signals its ligand-stimulated endocytosis: *Cell*, v. 84, p. 277-87.
- Hidalgo, M., and E. K. Rowinsky, 2000, The rapamycin-sensitive signal transduction pathway as a target for cancer therapy: *Oncogene*, v. 19, p. 6680-6.
- Hinnebusch, A. G., 2005, Translational regulation of GCN4 and the general amino acid control of yeast: *Annu Rev Microbiol*, v. 59, p. 407-50.
- Hochstrasser, M., 1996, Ubiquitin-dependent protein degradation: *Annu Rev Genet*, v. 30, p. 405-39.
- Holsbeeks, I., O. Lagatie, A. Van Nuland, S. Van de Velde, and J. M. Thevelein, 2004, The eukaryotic plasma membrane as a nutrient-sensing device: *Trends Biochem Sci*, v. 29, p. 556-64.
- Hopkins, C. R., A. Gibson, M. Shipman, and K. Miller, 1990, Movement of internalized ligand-receptor complexes along a continuous endosomal reticulum: *Nature*, v. 346, p. 335-9.
- Hoppe, T., K. Matuschewski, M. Rape, S. Schlenker, H. D. Ulrich, and S. Jentsch, 2000, Activation of a membrane-bound transcription factor by regulated ubiquitin/proteasome-dependent processing: *Cell*, v. 102, p. 577-86.
- Hosoi, H., M. B. Dilling, L. N. Liu, M. K. Danks, T. Shikata, A. Sekulic, R. T. Abraham, J. C. Lawrence, and P. J. Houghton, 1998, Studies on the mechanism of resistance to rapamycin in human cancer cells: *Mol Pharmacol*, v. 54, p. 815-24.
- Huibregtse, J. M., M. Scheffner, S. Beaudenon, and P. M. Howley, 1995, A family of proteins structurally and functionally related to the E6-AP ubiquitin-protein ligase: *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 92, p. 2563-7.
- Huibregtse, J. M., M. Scheffner, and P. M. Howley, 1994, E6-AP directs the HPV E6-dependent inactivation of p53 and is representative of a family of structurally and functionally related proteins: *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, v. 59, p. 237-45.
- Hunter, T., and G. D. Plowman, 1997, The protein kinases of budding yeast: six score and more: *Trends Biochem Sci*, v. 22, p. 18-22.
- Huotari, J., and A. Helenius, 2011, Endosome maturation: *EMBO J*, v. 30, p. 3481-500.

- Hurley, J. H., and S. D. Emr, 2006, The ESCRT complexes: structure and mechanism of a membrane-trafficking network: *Annu Rev Biophys Biomol Struct*, v. 35, p. 277-98.
- Iesmantavicius, V., B. T. Weinert, and C. Choudhary, 2014, Convergence of ubiquitylation and phosphorylation signaling in rapamycin-treated yeast cells: *Mol Cell Proteomics*, v. 13, p. 1979-92.
- Ingham, R. J., G. Gish, and T. Pawson, 2004, The Nedd4 family of E3 ubiquitin ligases: functional diversity within a common modular architecture: *Oncogene*, v. 23, p. 1972-84.
- Ito, H., Y. Fukuda, K. Murata, and A. Kimura, 1983, Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations: *J Bacteriol*, v. 153, p. 163-8.
- Jacinto, E., B. Guo, K. T. Arndt, T. Schmelzle, and M. N. Hall, 2001, TIP41 interacts with TAP42 and negatively regulates the TOR signaling pathway: *Mol Cell*, v. 8, p. 1017-26.
- Jenkins, G. M., A. Richards, T. Wahl, C. Mao, L. Obeid, and Y. Hannun, 1997, Involvement of yeast sphingolipids in the heat stress response of *Saccharomyces cerevisiae*: *J Biol Chem*, v. 272, p. 32566-72.
- Jiang, Y., and J. R. Broach, 1999, Tor proteins and protein phosphatase 2A reciprocally regulate Tap42 in controlling cell growth in yeast: *EMBO J*, v. 18, p. 2782-92.
- Kahm, M., C. Navarrete, V. Llopis-Torregrosa, R. Herrera, L. Barreto, L. Yenush, J. Arino, J. Ramos, and M. Kschischo, 2012, Potassium Starvation in Yeast: Mechanisms of Homeostasis Revealed by Mathematical Modeling: *Plos Computational Biology*, v. 8.
- Kaksonen, M., C. P. Toret, and D. G. Drubin, 2006, Harnessing actin dynamics for clathrin-mediated endocytosis: *Nat Rev Mol Cell Biol*, v. 7, p. 404-14.
- Kamada, Y., Y. Fujioka, N. N. Suzuki, F. Inagaki, S. Wullschleger, R. Loewith, M. N. Hall, and Y. Ohsumi, 2005, Tor2 directly phosphorylates the AGC kinase Ypk2 to regulate actin polarization: *Mol Cell Biol*, v. 25, p. 7239-48.
- Kamada, Y., K. Yoshino, C. Kondo, T. Kawamata, N. Oshiro, K. Yonezawa, and Y. Ohsumi, 2010, Tor directly controls the Atg1 kinase complex to regulate autophagy: *Mol Cell Biol*, v. 30, p. 1049-58.
- Kaouass, M., M. Audette, D. Ramotar, S. Verma, D. De Montigny, I. Gamache, K. Torossian, and R. Poulin, 1997, The STK2 gene, which encodes a putative Ser/Thr protein kinase, is required for high-affinity spermidine transport in *Saccharomyces cerevisiae*: *Mol Cell Biol*, v. 17, p. 2994-3004.
- Katzmann, D. J., G. Odorizzi, and S. D. Emr, 2002, Receptor downregulation and multivesicular-body sorting: *Nat Rev Mol Cell Biol*, v. 3, p. 893-905.
- Kee, Y., W. Muñoz, N. Lyon, and J. M. Huibregtse, 2006, The deubiquitinating enzyme Ubp2 modulates Rsp5-dependent Lys63-linked polyubiquitin conjugates in *Saccharomyces cerevisiae*: *J Biol Chem*, v. 281, p. 36724-31.
- Kelm, K. B., G. Huyer, J. C. Huang, and S. Michaelis, 2004, The internalization of yeast Ste6p follows an ordered series of events involving phosphorylation, ubiquitination, recognition and endocytosis: *Traffic*, v. 5, p. 165-80.
- Kingsbury, J. M., N. D. Sen, T. Maeda, J. Heitman, and M. E. Cardenas, 2014, Endolysosomal membrane trafficking complexes drive nutrient-dependent TORC1 signaling to control cell growth in *Saccharomyces cerevisiae*: *Genetics*, v. 196, p. 1077-89.
- Kishimoto, T., Y. Sun, C. Buser, J. Liu, A. Michelot, and D. G. Drubin, 2011, Determinants of endocytic membrane geometry, stability, and scission: *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 108, p. E979-88.
- Klionsky, D. J., and S. D. Emr, 2000, Autophagy as a regulated pathway of cellular degradation: *Science*, v. 290, p. 1717-21.
- Ko, C. H., and R. F. Gaber, 1991, TRK1 and TRK2 encode structurally related K⁺ transporters in *Saccharomyces cerevisiae*: *Mol Cell Biol*, v. 11, p. 4266-73.
- Ko, C. H., H. Liang, and R. F. Gaber, 1993, Roles of multiple glucose transporters in *Saccharomyces cerevisiae*: *Mol Cell Biol*, v. 13, p. 638-48.

- Komander, D., and M. Rape, 2012, The ubiquitin code: *Annu Rev Biochem*, v. 81, p. 203-29.
- Kota, J., M. Melin-Larsson, P. O. Ljungdahl, and H. Forsberg, 2007, Ssh4, Rcr2 and Rcr1 affect plasma membrane transporter activity in *Saccharomyces cerevisiae*: *Genetics*, v. 175, p. 1681-94.
- Krauke, Y., and H. Sychrova, 2010, Four pathogenic *Candida* species differ in salt tolerance: *Curr Microbiol*, v. 61, p. 335-9.
- Kulathu, Y., and D. Komander, 2012, Atypical ubiquitylation - the unexplored world of polyubiquitin beyond Lys48 and Lys63 linkages: *Nat Rev Mol Cell Biol*, v. 13, p. 508-23.
- Kunz, J., R. Henriquez, U. Schneider, M. Deuter-Reinhard, N. R. Movva, and M. N. Hall, 1993, Target of rapamycin in yeast, TOR2, is an essential phosphatidylinositol kinase homolog required for G1 progression: *Cell*, v. 73, p. 585-96.
- Lanker, S., M. H. Valdivieso, and C. Wittenberg, 1996, Rapid degradation of the G1 cyclin Cln2 induced by CDK-dependent phosphorylation: *Science*, v. 271, p. 1597-601.
- Lauwers, E., and B. André, 2006, Association of yeast transporters with detergent-resistant membranes correlates with their cell-surface location: *Traffic*, v. 7, p. 1045-59.
- Lauwers, E., Z. Erpapazoglou, R. Haguenaer-Tsapis, and B. Andre, 2010, The ubiquitin code of yeast permease trafficking: *Trends in Cell Biology*, v. 20, p. 196-204.
- Lecchi, S., C. J. Nelson, K. E. Allen, D. L. Swaney, K. L. Thompson, J. J. Coon, M. R. Sussman, and C. W. Slayman, 2007, Tandem phosphorylation of Ser-911 and Thr-912 at the C terminus of yeast plasma membrane H⁺-ATPase leads to glucose-dependent activation: *J Biol Chem*, v. 282, p. 35471-81.
- Lefkowitz, R. J., K. Rajagopal, and E. J. Whalen, 2006, New roles for beta-arrestins in cell signaling: not just for seven-transmembrane receptors: *Mol Cell*, v. 24, p. 643-52.
- Lempiäinen, H., A. Uotila, J. Urban, I. Dohnal, G. Ammerer, R. Loewith, and D. Shore, 2009, Sfp1 interaction with TORC1 and Mrs6 reveals feedback regulation on TOR signaling: *Mol Cell*, v. 33, p. 704-16.
- Leon, S., Z. Erpapazoglou, and R. Haguenaer-Tsapis, 2008, Ear1p and Ssh4p are new adaptors of the ubiquitin ligase Rsp5p for cargo and sorting at multivesicular bodies: *Molecular Biology of the Cell*, v. 19, p. 2379-2388.
- Leon, S., and R. Haguenaer-Tsapis, 2009, Ubiquitin ligase adaptors: Regulators of ubiquitylation and endocytosis of plasma membrane proteins: *Experimental Cell Research*, v. 315, p. 1574-1583.
- Liao, H. C., and M. Y. Chen, 2012, Target of rapamycin complex 2 signals to downstream effector yeast protein kinase 2 (Ypk2) through adheres-voraciously-to-target-of-rapamycin-2 protein 1 (Avo1) in *Saccharomyces cerevisiae*: *J Biol Chem*, v. 287, p. 6089-99.
- Lin, C. H., J. A. MacGum, T. Chu, C. J. Stefan, and S. D. Emr, 2008, Arrestin-Related Ubiquitin-Ligase Adaptors Regulate Endocytosis and Protein Turnover at the Cell Surface: *Cell*, v. 135, p. 714-725.
- Liu, J., A. Sitaram, and C. G. Burd, 2007, Regulation of copper-dependent endocytosis and vacuolar degradation of the yeast copper transporter, Ctr1p, by the Rsp5 ubiquitin ligase: *Traffic*, v. 8, p. 1375-84.
- Liu, X. F., F. Supek, N. Nelson, and V. C. Culotta, 1997, Negative control of heavy metal uptake by the *Saccharomyces cerevisiae* BSD2 gene: *J Biol Chem*, v. 272, p. 11763-9.
- Liu, Y., G. Vidanes, Y. C. Lin, S. Mori, and W. Siede, 2000, Characterization of a *Saccharomyces cerevisiae* homologue of *Schizosaccharomyces pombe* Chk1 involved in DNA-damage-induced M-phase arrest: *Mol Gen Genet*, v. 262, p. 1132-46.
- Loewith, R., and M. N. Hall, 2011, Target of rapamycin (TOR) in nutrient signaling and growth control: *Genetics*, v. 189, p. 1177-201.
- Loewith, R., E. Jacinto, S. Wullschleger, A. Lorberg, J. L. Crespo, D. Bonenfant, W. Oppliger, P. Jenoe, and M. N. Hall, 2002, Two TOR complexes, only one of which is rapamycin sensitive, have distinct roles in cell growth control: *Mol Cell*, v. 10, p. 457-68.

- Lorenz, M. C., and J. Heitman, 1995, TOR mutations confer rapamycin resistance by preventing interaction with FKBP12-rapamycin: *J Biol Chem*, v. 270, p. 27531-7.
- LUBIN, M., and H. L. ENNIS, 1964, ON THE ROLE OF INTRACELLULAR POTASSIUM IN PROTEIN SYNTHESIS: *Biochim Biophys Acta*, v. 80, p. 614-31.
- Luhtala, N., and G. Odorizzi, 2004, Bro1 coordinates deubiquitination in the multivesicular body pathway by recruiting Doa4 to endosomes: *J Cell Biol*, v. 166, p. 717-29.
- Lussier, M., A. M. White, J. Sheraton, T. di Paolo, J. Treadwell, S. B. Southard, C. I. Horenstein, J. Chen-Weiner, A. F. Ram, J. C. Kapteyn, T. W. Roemer, D. H. Vo, D. C. Bondoc, J. Hall, W. W. Zhong, A. M. Sdicu, J. Davies, F. M. Klis, P. W. Robbins, and H. Bussey, 1997, Large scale identification of genes involved in cell surface biosynthesis and architecture in *Saccharomyces cerevisiae*: *Genetics*, v. 147, p. 435-50.
- MacGurn, J. A., P. C. Hsu, M. B. Smolka, and S. D. Emr, 2011, TORC1 regulates endocytosis via Npr1-mediated phosphoinhibition of a ubiquitin ligase adaptor: *Cell*, v. 147, p. 1104-17.
- Madania, A., P. Dumoulin, S. Grava, H. Kitamoto, C. Schärer-Brodbeck, A. Soulard, V. Moreau, and B. Winsor, 1999, The *Saccharomyces cerevisiae* homologue of human Wiskott-Aldrich syndrome protein Las17p interacts with the Arp2/3 complex: *Mol Biol Cell*, v. 10, p. 3521-38.
- Madrid, R., M. J. Gómez, J. Ramos, and A. Rodríguez-Navarro, 1998, Ectopic potassium uptake in *trk1 trk2* mutants of *Saccharomyces cerevisiae* correlates with a highly hyperpolarized membrane potential: *J Biol Chem*, v. 273, p. 14838-44.
- Magasanik, B., and C. A. Kaiser, 2002, Nitrogen regulation in *Saccharomyces cerevisiae*: *Gene*, v. 290, p. 1-18.
- McNatt, M. W., I. McKittrick, M. West, and G. Odorizzi, 2007, Direct binding to Rsp5 mediates ubiquitin-independent sorting of Sna3 via the multivesicular body pathway: *Mol Biol Cell*, v. 18, p. 697-706.
- Mendoza, I., F. Rubio, A. Rodríguez-Navarro, and J. M. Pardo, 1994, The protein phosphatase calcineurin is essential for NaCl tolerance of *Saccharomyces cerevisiae*: *J Biol Chem*, v. 269, p. 8792-6.
- Merchan, S., D. Bernal, R. Serrano, and L. Yenush, 2004, Response of the *Saccharomyces cerevisiae* Mpk1 mitogen-activated protein kinase pathway to increases in internal turgor pressure caused by loss of Ppz protein phosphatases: *Eukaryotic Cell*, v. 3, p. 100-107.
- Merhi, A., and B. Andre, 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*, v. 32, p. 4510-4522.
- Metzger, M. B., V. A. Hristova, and A. M. Weissman, 2012, HECT and RING finger families of E3 ubiquitin ligases at a glance: *J Cell Sci*, v. 125, p. 531-7.
- Miranda, M., and A. Sorkin, 2007, Regulation of receptors and transporters by ubiquitination: new insights into surprisingly similar mechanisms: *Mol Interv*, v. 7, p. 157-67.
- Mittal, R., and H. T. McMahon, 2009, Arrestins as adaptors for ubiquitination in endocytosis and sorting: *Embo Reports*, v. 10, p. 41-43.
- Mizushima, N., 2007, Autophagy: process and function: *Genes Dev*, v. 21, p. 2861-73.
- Mizushima, N., A. Yamamoto, M. Hatano, Y. Kobayashi, Y. Kabeya, K. Suzuki, T. Tokuhisa, Y. Ohsumi, and T. Yoshimori, 2001, Dissection of autophagosome formation using Apg5-deficient mouse embryonic stem cells: *J Cell Biol*, v. 152, p. 657-68.
- Montiel, V., and J. Ramos, 2007, Intracellular Na and K distribution in *Debaryomyces hansenii*. Cloning and expression in *Saccharomyces cerevisiae* of DhNHX1: *FEMS Yeast Res*, v. 7, p. 102-9.
- Moreau, V., J. M. Galan, G. Devilliers, R. Haguener-Tsapis, and B. Winsor, 1997, The yeast actin-related protein Arp2p is required for the internalization step of endocytosis: *Mol Biol Cell*, v. 8, p. 1361-75.

- Morris, C. E., and U. Homann, 2001, Cell surface area regulation and membrane tension: *J Membr Biol*, v. 179, p. 79-102.
- Morton, W. M., K. R. Ayscough, and P. J. McLaughlin, 2000, Latrunculin alters the actin-monomer subunit interface to prevent polymerization: *Nat Cell Biol*, v. 2, p. 376-8.
- Mulet, J. M., M. P. Leube, S. J. Kron, G. Rios, G. R. Fink, and R. Serrano, 1999, A novel mechanism of ion homeostasis and salt tolerance in yeast: the Hal4 and Hal5 protein kinases modulate the Trk1-Trk2 potassium transporter: *Mol Cell Biol*, v. 19, p. 3328-37.
- Mulet, J. M., V. Llopis-Torregrosa, C. Primo, M. C. Marqués, and L. Yenush, 2013, Endocytic regulation of alkali metal transport proteins in mammals, yeast and plants: *Curr Genet*, v. 59, p. 207-30.
- Mulet, J. M., D. E. Martin, R. Loewith, and M. N. Hall, 2006, Mutual antagonism of target of rapamycin and calcineurin signaling: *J Biol Chem*, v. 281, p. 33000-7.
- Munn, A. L., and H. Riezman, 1994, Endocytosis is required for the growth of vacuolar H(+)-ATPase-defective yeast: identification of six new END genes: *J Cell Biol*, v. 127, p. 373-86.
- Munn, A. L., B. J. Stevenson, M. I. Geli, and H. Riezman, 1995, end5, end6, and end7: mutations that cause actin delocalization and block the internalization step of endocytosis in *Saccharomyces cerevisiae*: *Mol Biol Cell*, v. 6, p. 1721-42.
- Munson, A. M., D. H. Haydon, S. L. Love, G. L. Fell, V. R. Palanivel, and A. G. Rosenwald, 2004, Yeast ARL1 encodes a regulator of K⁺ influx: *J Cell Sci*, v. 117, p. 2309-20.
- Murguía, J. R., J. M. Bellés, and R. Serrano, 1995, A salt-sensitive 3'(2'),5'-bisphosphate nucleotidase involved in sulfate activation: *Science*, v. 267, p. 232-4.
- Murguía, J. R., J. M. Bellés, and R. Serrano, 1996, The yeast HAL2 nucleotidase is an in vivo target of salt toxicity: *J Biol Chem*, v. 271, p. 29029-33.
- Murphy, R. F., 1991, Maturation models for endosome and lysosome biogenesis: *Trends Cell Biol*, v. 1, p. 77-82.
- Muñoz, I., E. Simón, N. Casals, J. Clotet, and J. Ariño, 2003, Identification of multicopy suppressors of cell cycle arrest at the G1-S transition in *Saccharomyces cerevisiae*: *Yeast*, v. 20, p. 157-69.
- Nair, U., M. Thumm, D. J. Klionsky, and R. Krick, 2011, GFP-Atg8 protease protection as a tool to monitor autophagosome biogenesis: *Autophagy*, v. 7, p. 1546-50.
- Nannapaneni, S., D. Wang, S. Jain, B. Schroeder, C. Highfill, L. Reustle, D. Pittsley, A. Maysent, S. Moulder, R. McDowell, and K. Kim, 2010, The yeast dynamin-like protein Vps1: vps1 mutations perturb the internalization and the motility of endocytic vesicles and endosomes via disorganization of the actin cytoskeleton: *Eur J Cell Biol*, v. 89, p. 499-508.
- Nass, R., K. W. Cunningham, and R. Rao, 1997, Intracellular sequestration of sodium by a novel Na⁺/H⁺ exchanger in yeast is enhanced by mutations in the plasma membrane H⁺-ATPase. Insights into mechanisms of sodium tolerance: *J Biol Chem*, v. 272, p. 26145-52.
- Navarre, C., and A. Goffeau, 2000, Membrane hyperpolarization and salt sensitivity induced by deletion of PMP3, a highly conserved small protein of yeast plasma membrane: *EMBO J*, v. 19, p. 2515-24.
- Navarrete, C., S. Petrezselyova, L. Barreto, J. L. Martinez, J. Zahradka, J. Arino, H. Sychrova, and J. Ramos, 2010, Lack of main K⁺ uptake systems in *Saccharomyces cerevisiae* cells affects yeast performance in both potassium-sufficient and potassium-limiting conditions: *Fems Yeast Research*, v. 10, p. 508-517.
- Nelissen, B., R. De Wachter, and A. Goffeau, 1997, Classification of all putative permeases and other membrane plurispanners of the major facilitator superfamily encoded by the complete genome of *Saccharomyces cerevisiae*: *FEMS Microbiol Rev*, v. 21, p. 113-34.
- Nickerson, D. P., M. West, and G. Odorizzi, 2006, Did2 coordinates Vps4-mediated dissociation of ESCRT-III from endosomes: *J Cell Biol*, v. 175, p. 715-20.

- Nikko, E., and H. R. Pelham, 2009, Arrestin-mediated endocytosis of yeast plasma membrane transporters: *Traffic*, v. 10, p. 1856-67.
- Nikko, E., J. A. Sullivan, and H. R. Pelham, 2008, Arrestin-like proteins mediate ubiquitination and endocytosis of the yeast metal transporter Smf1: *EMBO Rep*, v. 9, p. 1216-21.
- Niles, B. J., H. Mogri, A. Hill, A. Vlahakis, and T. Powers, 2012, Plasma membrane recruitment and activation of the AGC kinase Ypk1 is mediated by target of rapamycin complex 2 (TORC2) and its effector proteins Slm1 and Slm2: *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 109, p. 1536-41.
- Niles, B. J., and T. Powers, 2012, Plasma membrane proteins Slm1 and Slm2 mediate activation of the AGC kinase Ypk1 by TORC2 and sphingolipids in *S. cerevisiae*: *Cell Cycle*, v. 11, p. 3745-9.
- Noda, T., and Y. Ohsumi, 1998, Tor, a phosphatidylinositol kinase homologue, controls autophagy in yeast: *J Biol Chem*, v. 273, p. 3963-6.
- Nozaki, T., K. Nishimura, A. J. Michael, T. Maruyama, Y. Kakinuma, and K. Igarashi, 1996, A second gene encoding a putative serine/threonine protein kinase which enhances spermine uptake in *Saccharomyces cerevisiae*: *Biochem Biophys Res Commun*, v. 228, p. 452-8.
- O'Donnell, A. F., A. Apffel, R. G. Gardner, and M. S. Cyert, 2010, Alpha-arrestins Aly1 and Aly2 regulate intracellular trafficking in response to nutrient signaling: *Mol Biol Cell*, v. 21, p. 3552-66.
- O'Donnell, A. F., L. Huang, J. Thorner, and M. S. Cyert, 2013, A calcineurin-dependent switch controls the trafficking function of α -arrestin Aly1/Art6: *J Biol Chem*.
- Oestreich, A. J., M. Aboian, J. Lee, I. Azmi, J. Payne, R. Issaka, B. A. Davies, and D. J. Katzmann, 2007, Characterization of multiple multivesicular body sorting determinants within Sna3: a role for the ubiquitin ligase Rsp5: *Mol Biol Cell*, v. 18, p. 707-20.
- Okorokov, L. A., L. P. Lichko, and I. S. Kulaev, 1980, Vacuoles: main compartments of potassium, magnesium, and phosphate ions in *Saccharomyces carlsbergensis* cells: *J Bacteriol*, v. 144, p. 661-5.
- Page, M. J., and E. Di Cera, 2006, Role of Na⁺ and K⁺ in enzyme function: *Physiol Rev*, v. 86, p. 1049-92.
- Parton, R. G., and M. A. del Pozo, 2013, Caveolae as plasma membrane sensors, protectors and organizers: *Nat Rev Mol Cell Biol*, v. 14, p. 98-112.
- Pascual-Ahuir, A., and M. Proft, 2007, The Sch9 kinase is a chromatin-associated transcriptional activator of osmotic stress-responsive genes: *EMBO J*, v. 26, p. 3098-108.
- Patwari, P., and R. T. Lee, 2012, An expanded family of arrestins regulate metabolism: *Trends Endocrinol Metab*, v. 23, p. 216-22.
- Paumi, C. M., J. Menendez, A. Arnoldo, K. Engels, K. R. Iyer, S. Thaminy, O. Georgiev, Y. Barral, S. Michaelis, and I. Stagljar, 2007, Mapping protein-protein interactions for the yeast ABC transporter Ycf1p by integrated split-ubiquitin membrane yeast two-hybrid analysis: *Mol Cell*, v. 26, p. 15-25.
- Peng, J., D. Schwartz, J. E. Elias, C. C. Thoreen, D. Cheng, G. Marsischky, J. Roelofs, D. Finley, and S. P. Gygi, 2003, A proteomics approach to understanding protein ubiquitination: *Nat Biotechnol*, v. 21, p. 921-6.
- Perez-Valle, J., H. Jenkins, S. Merchan, V. Montiel, J. Ramos, S. Sharma, R. Serrano, and L. Yenush, 2007, Key role for intracellular K⁺ and protein kinases Sat4/Hal4 and Hal5 in the plasma membrane stabilization of yeast nutrient transporters: *Molecular and Cellular Biology*, v. 27, p. 5725-5736.
- Perez-Valle, J., J. Rothe, C. Primo, M. Martinez Pastor, J. Arino, A. Pascual-Ahuir, J. Miguel Mulet, R. Serrano, and L. Yenush, 2010, Hal4 and Hal5 Protein Kinases Are Required for General Control of Carbon and Nitrogen Uptake and Metabolism: *Eukaryotic Cell*, v. 9, p. 1881-1890.

- Perkins, J., and G. M. Gadd, 1993, Accumulation and intracellular compartmentation of lithium ions in *Saccharomyces cerevisiae*: FEMS Microbiol Lett, v. 107, p. 255-60.
- Perlin, D. S., C. L. Brown, and J. E. Haber, 1988, Membrane potential defect in hygromycin B-resistant pma1 mutants of *Saccharomyces cerevisiae*: J Biol Chem, v. 263, p. 18118-22.
- Perrais, D., and C. J. Merrifield, 2005, Dynamics of endocytic vesicle creation: Dev Cell, v. 9, p. 581-92.
- Petrezselyova, S., J. Zahradka, and H. Sychrova, 2010, *Saccharomyces cerevisiae* BY4741 and W303-1A laboratory strains differ in salt tolerance: Fungal Biol, v. 114, p. 144-50.
- Pickart, C. M., 2001, Mechanisms underlying ubiquitination: Annu Rev Biochem, v. 70, p. 503-33.
- Pickart, C. M., and D. Fushman, 2004, Polyubiquitin chains: polymeric protein signals: Curr Opin Chem Biol, v. 8, p. 610-6.
- Polo, S., and P. P. Di Fiore, 2008, Finding the Right Partner: Science or ART?: Cell, v. 135, p. 590-592.
- Portillo, F., 2000, Regulation of plasma membrane H(+)-ATPase in fungi and plants: Biochim Biophys Acta, v. 1469, p. 31-42.
- Powers, T., 2007, TOR signaling and S6 kinase 1: Yeast catches up: Cell Metab, v. 6, p. 1-2.
- Proft, M., and R. Serrano, 1999, Repressors and upstream repressing sequences of the stress-regulated ENA1 gene in *Saccharomyces cerevisiae*: bZIP protein Sko1p confers HOG-dependent osmotic regulation: Molecular and Cellular Biology, v. 19, p. 537-546.
- Ptacek, J., G. Devgan, G. Michaud, H. Zhu, X. Zhu, J. Fasolo, H. Guo, G. Jona, A. Breitskreutz, R. Sopko, R. R. McCartney, M. C. Schmidt, N. Rachidi, S. J. Lee, A. S. Mah, L. Meng, M. J. Stark, D. F. Stern, C. De Virgilio, M. Tyers, B. Andrews, M. Gerstein, B. Schweitzer, P. F. Predki, and M. Snyder, 2005, Global analysis of protein phosphorylation in yeast: Nature, v. 438, p. 679-84.
- Qian, S. B., X. Zhang, J. Sun, J. R. Bennink, J. W. Yewdell, and C. Patterson, 2010, mTORC1 links protein quality and quantity control by sensing chaperone availability: J Biol Chem, v. 285, p. 27385-95.
- Raiborg, C., and H. Stenmark, 2009, The ESCRT machinery in endosomal sorting of ubiquitylated membrane proteins: Nature, v. 458, p. 445-52.
- Rao, R., D. Drummond-Barbosa, and C. W. Slayman, 1993, Transcriptional regulation by glucose of the yeast PMA1 gene encoding the plasma membrane H(+)-ATPase: Yeast, v. 9, p. 1075-84.
- Raymond, C. K., I. Howald-Stevenson, C. A. Vater, and T. H. Stevens, 1992, Morphological classification of the yeast vacuolar protein sorting mutants: evidence for a prevacuolar compartment in class E vps mutants: Mol Biol Cell, v. 3, p. 1389-402.
- Reifenberger, E., E. Boles, and M. Ciriacy, 1997, Kinetic characterization of individual hexose transporters of *Saccharomyces cerevisiae* and their relation to the triggering mechanisms of glucose repression: Eur J Biochem, v. 245, p. 324-33.
- Reinke, A., S. Anderson, J. M. McCaffery, J. Yates, S. Aronova, S. Chu, S. Fairclough, C. Iverson, K. P. Wedaman, and T. Powers, 2004, TOR complex 1 includes a novel component, Tco89p (YPL180w), and cooperates with Ssd1p to maintain cellular integrity in *Saccharomyces cerevisiae*: J Biol Chem, v. 279, p. 14752-62.
- Ren, Q., K. Chen, and I. T. Paulsen, 2007, TransportDB: a comprehensive database resource for cytoplasmic membrane transport systems and outer membrane channels: Nucleic Acids Res, v. 35, p. D274-9.
- Rios, G., A. Ferrando, and R. Serrano, 1997, Mechanisms of salt tolerance conferred by overexpression of the HAL1 gene in *Saccharomyces cerevisiae*: Yeast, v. 13, p. 515-28.
- Robertson, A. S., E. Smythe, and K. R. Ayscough, 2009, Functions of actin in endocytosis: Cell Mol Life Sci, v. 66, p. 2049-65.

- Rodríguez, M. S., C. Gwizdek, R. Haguenaer-Tsapis, and C. Dargemont, 2003, The HECT ubiquitin ligase Rsp5p is required for proper nuclear export of mRNA in *Saccharomyces cerevisiae*: *Traffic*, v. 4, p. 566-75.
- Rodríguez-Navarro, A., and J. Ramos, 1984, Dual system for potassium transport in *Saccharomyces cerevisiae*: *J Bacteriol*, v. 159, p. 940-5.
- Roelants, F. M., D. K. Breslow, A. Muir, J. S. Weissman, and J. Thorner, 2011, Protein kinase Ypk1 phosphorylates regulatory proteins Orm1 and Orm2 to control sphingolipid homeostasis in *Saccharomyces cerevisiae*: *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 108, p. 19222-7.
- Roelants, F. M., P. D. Torrance, N. Bezman, and J. Thorner, 2002, Pkh1 and Pkh2 differentially phosphorylate and activate Ypk1 and Ykr2 and define protein kinase modules required for maintenance of cell wall integrity: *Mol Biol Cell*, v. 13, p. 3005-28.
- Roelants, F. M., P. D. Torrance, and J. Thorner, 2004, Differential roles of PDK1- and PDK2-phosphorylation sites in the yeast AGC kinases Ypk1, Pkc1 and Sch9: *Microbiology*, v. 150, p. 3289-304.
- Roomans, G. M., and L. A. Sevéus, 1976, Subcellular localization of diffusible ions in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: quantitative microprobe analysis of thin freeze-dried sections: *J Cell Sci*, v. 21, p. 119-27.
- Rotin, D., O. Staub, and R. Haguenaer-Tsapis, 2000, Ubiquitination and endocytosis of plasma membrane proteins: role of Nedd4/Rsp5p family of ubiquitin-protein ligases: *J Membr Biol*, v. 176, p. 1-17.
- Rubenstein, E. M., and M. C. Schmidt, 2007, Mechanisms regulating the protein kinases of *Saccharomyces cerevisiae*: *Eukaryot Cell*, v. 6, p. 571-83.
- Rue, S. M., S. Mattei, S. Saksena, and S. D. Emr, 2008, Novel Ist1-Did2 complex functions at a late step in multivesicular body sorting: *Mol Biol Cell*, v. 19, p. 475-84.
- Ruiz, A., L. Yenush, and J. Arino, 2003, Regulation of ENA1 Na⁺-ATPase gene expression by the Ppz1 protein phosphatase is mediated by the calcineurin pathway: *Eukaryotic Cell*, v. 2, p. 937-948.
- Saier, M. H., M. R. Yen, K. Noto, D. G. Tamang, and C. Elkan, 2009, The Transporter Classification Database: recent advances: *Nucleic Acids Res*, v. 37, p. D274-8.
- Saksena, S., J. Wahlman, D. Teis, A. E. Johnson, and S. D. Emr, 2009, Functional reconstitution of ESCRT-III assembly and disassembly: *Cell*, v. 136, p. 97-109.
- Sasaki, T., and H. Takagi, 2013, Phosphorylation of a conserved Thr357 in yeast Nedd4-like ubiquitin ligase Rsp5 is involved in down-regulation of the general amino acid permease Gap1: *Genes Cells*.
- Schlesser, A., S. Ulaszewski, M. Ghislain, and A. Goffeau, 1988, A second transport ATPase gene in *Saccharomyces cerevisiae*: *J Biol Chem*, v. 263, p. 19480-7.
- Schmelzle, T., and M. N. Hall, 2000, TOR, a central controller of cell growth: *Cell*, v. 103, p. 253-62.
- Schmelzle, T., S. B. Helliwell, and M. N. Hall, 2002, Yeast protein kinases and the RHO1 exchange factor TUS1 are novel components of the cell integrity pathway in yeast: *Mol Cell Biol*, v. 22, p. 1329-39.
- Schmidt, A., T. Beck, A. Koller, J. Kunz, and M. N. Hall, 1998, The TOR nutrient signalling pathway phosphorylates NPR1 and inhibits turnover of the tryptophan permease: *EMBO J*, v. 17, p. 6924-31.
- Schmidt, A., M. Bickle, T. Beck, and M. N. Hall, 1997, The yeast phosphatidylinositol kinase homolog TOR2 activates RHO1 and RHO2 via the exchange factor ROM2: *Cell*, v. 88, p. 531-42.
- Schmidt, A., J. Kunz, and M. N. Hall, 1996, TOR2 is required for organization of the actin cytoskeleton in yeast: *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 93, p. 13780-5.
- Schmidt, O., and D. Teis, 2012, The ESCRT machinery: *Curr Biol*, v. 22, p. R116-20.
- Schreiber, S. L., 1991, Chemistry and biology of the immunophilins and their immunosuppressive ligands: *Science*, v. 251, p. 283-7.

- Schreiber, S. L., 1992, Immunophilin-sensitive protein phosphatase action in cell signaling pathways: *Cell*, v. 70, p. 365-8.
- Serrano, R., 1983, Purification and reconstitution of the proton-pumping ATPase of fungal and plant plasma membranes: *Arch Biochem Biophys*, v. 227, p. 1-8.
- Serrano, R., 1984, Plasma membrane ATPase of fungi and plants as a novel type of proton pump: *Curr Top Cell Regul*, v. 23, p. 87-126.
- Serrano, R., M. C. Kielland-Brandt, and G. R. Fink, 1986, Yeast plasma membrane ATPase is essential for growth and has homology with (Na⁺ + K⁺), K⁺- and Ca²⁺-ATPases: *Nature*, v. 319, p. 689-93.
- Seto, E. S., H. J. Bellen, and T. E. Lloyd, 2002, When cell biology meets development: endocytic regulation of signaling pathways: *Genes Dev*, v. 16, p. 1314-36.
- Shcherbik, N., Y. Kee, N. Lyon, J. M. Huibregtse, and D. S. Haines, 2004, A single PXY motif located within the carboxyl terminus of Spt23p and Mga2p mediates a physical and functional interaction with ubiquitin ligase Rsp5p: *J Biol Chem*, v. 279, p. 53892-8.
- Shcherbik, N., T. Zoladek, J. T. Nickels, and D. S. Haines, 2003, Rsp5p is required for ER bound Mga2p120 polyubiquitination and release of the processed/tethered transactivator Mga2p90: *Curr Biol*, v. 13, p. 1227-33.
- Shea, F. F., J. L. Rowell, Y. Li, T. H. Chang, and C. E. Alvarez, 2012, Mammalian alpha arrestins link activated seven transmembrane receptors to Nedd4 family e3 ubiquitin ligases and interact with beta arrestins: *PLoS One*, v. 7, p. e50557.
- Shields, S. B., A. J. Oestreich, S. Winistorfer, D. Nguyen, J. A. Payne, D. J. Katzmann, and R. Piper, 2009, ESCRT ubiquitin-binding domains function cooperatively during MVB cargo sorting: *J Cell Biol*, v. 185, p. 213-24.
- Shimobayashi, M., W. Oppliger, S. Moes, P. Jenö, and M. N. Hall, 2013, TORC1-regulated protein kinase Npr1 phosphorylates Orm to stimulate complex sphingolipid synthesis: *Mol Biol Cell*, v. 24, p. 870-81.
- Soetens, O., J. O. De Craene, and B. Andre, 2001, Ubiquitin is required for sorting to the vacuole of the yeast general amino acid permease, Gap1: *Journal of Biological Chemistry*, v. 276, p. 43949-43957.
- Song, W., and M. Carlson, 1998, Srb/mediator proteins interact functionally and physically with transcriptional repressor Sfl1: *EMBO J*, v. 17, p. 5757-65.
- Stan, R., M. M. McLaughlin, R. Cafferkey, R. K. Johnson, M. Rosenberg, and G. P. Livi, 1994, Interaction between FKBP12-rapamycin and TOR involves a conserved serine residue: *J Biol Chem*, v. 269, p. 32027-30.
- Staub, O., S. Dho, P. Henry, J. Correa, T. Ishikawa, J. McGlade, and D. Rotin, 1996, WW domains of Nedd4 bind to the proline-rich PY motifs in the epithelial Na⁺ channel deleted in Liddle's syndrome: *EMBO J*, v. 15, p. 2371-80.
- Stawiecka-Mirota, M., W. Pokrzywa, J. Morvan, T. Zoladek, R. Haguenaer-Tsapis, D. Urban-Grimal, and P. Morsomme, 2007, Targeting of Sna3p to the endosomal pathway depends on its interaction with Rsp5p and multivesicular body sorting on its ubiquitylation: *Traffic*, v. 8, p. 1280-96.
- Stefan, C. P., N. Zhang, T. Sokabe, A. Rivetta, C. L. Slayman, C. Montell, and K. W. Cunningham, 2013, Activation of an essential calcium signaling pathway in *Saccharomyces cerevisiae* by Kch1 and Kch2, putative low-affinity potassium transporters: *Eukaryot Cell*, v. 12, p. 204-14.
- Stimpson, H. E., M. J. Lewis, and H. R. Pelham, 2006, Transferrin receptor-like proteins control the degradation of a yeast metal transporter: *EMBO J*, v. 25, p. 662-72.
- Strick, R., P. L. Strissel, K. Gavrilov, and R. Levi-Setti, 2001, Cation-chromatin binding as shown by ion microscopy is essential for the structural integrity of chromosomes: *J Cell Biol*, v. 155, p. 899-910.

- Sullivan, J. A., M. J. Lewis, E. Nikko, and H. R. B. Pelham, 2007, Multiple interactions drive adaptor-mediated recruitment of the ubiquitin ligase Rsp5 to membrane proteins in vivo and in vitro: *Molecular Biology of the Cell*, v. 18, p. 2429-2440.
- Supply, P., A. Wach, and A. Goffeau, 1993, Enzymatic properties of the PMA2 plasma membrane-bound H(+)-ATPase of *Saccharomyces cerevisiae*: *J Biol Chem*, v. 268, p. 19753-9.
- Tabuchi, M., A. Audhya, A. B. Parsons, C. Boone, and S. D. Emr, 2006, The phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate and TORC2 binding proteins Slm1 and Slm2 function in sphingolipid regulation: *Mol Cell Biol*, v. 26, p. 5861-75.
- Tate, J. J., and T. G. Cooper, 2013, Five conditions commonly used to down-regulate tor complex 1 generate different physiological situations exhibiting distinct requirements and outcomes: *J Biol Chem*, v. 288, p. 27243-62.
- Teis, D., S. Saksena, and S. D. Emr, 2008, Ordered assembly of the ESCRT-III complex on endosomes is required to sequester cargo during MVB formation: *Dev Cell*, v. 15, p. 578-89.
- Tenay, B., E. Kimberlin, M. Williams, J. Denise, J. Fakilahyel, and K. Kim, 2013, Inactivation of Tor proteins affects the dynamics of endocytic proteins in early stage of endocytosis: *J Biosci*, v. 38, p. 351-61.
- Thomas, G., and M. N. Hall, 1997, TOR signalling and control of cell growth: *Curr Opin Cell Biol*, v. 9, p. 782-7.
- Umebayashi, K., and A. Nakano, 2003, Ergosterol is required for targeting of tryptophan permease to the yeast plasma membrane: *J Cell Biol*, v. 161, p. 1117-31.
- Urban, J., A. Soulard, A. Huber, S. Lippman, D. Mukhopadhyay, O. Deloche, V. Wanke, D. Anrather, G. Ammerer, H. Riezman, J. R. Broach, C. De Virgilio, M. N. Hall, and R. Loewith, 2007, Sch9 is a major target of TORC1 in *Saccharomyces cerevisiae*: *Mol Cell*, v. 26, p. 663-74.
- Vallejo, C. G., and R. Serrano, 1989, Physiology of mutants with reduced expression of plasma membrane H⁺-ATPase: *Yeast*, v. 5, p. 307-19.
- Vandenbol, M., J. C. Jauniaux, and M. Grenson, 1990, The *Saccharomyces cerevisiae* NPR1 gene required for the activity of ammonia-sensitive amino acid permeases encodes a protein kinase homologue: *Mol Gen Genet*, v. 222, p. 393-9.
- Vandenbol, M., J. C. Jauniaux, S. Vissers, and M. Grenson, 1987, Isolation of the NPR1 gene responsible for the reactivation of ammonia-sensitive amino-acid permeases in *Saccharomyces cerevisiae*. RNA analysis and gene dosage effects: *Eur J Biochem*, v. 164, p. 607-12.
- Vargas, R. C., R. García-Salcedo, S. Tenreiro, M. C. Teixeira, A. R. Fernandes, J. Ramos, and I. Sá-Correia, 2007, *Saccharomyces cerevisiae* multidrug resistance transporter Qdr2 is implicated in potassium uptake, providing a physiological advantage to quinidine-stressed cells: *Eukaryot Cell*, v. 6, p. 134-42.
- Vlahakis, A., M. Graef, J. Nunnari, and T. Powers, 2014, TOR complex 2-Ypk1 signaling is an essential positive regulator of the general amino acid control response and autophagy: *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 111, p. 10586-91.
- Vojtek, A. B., Cooper, J.A. and Hollenberg, S.M., 1997, The Yeast Two-hybrid System, *in* P. L. a. F. Bartel, S., ed., *The Yeast Two-hybrid System*: Oxford, Oxford University Press, p. 29–42.
- Wang, H., X. Wang, and Y. Jiang, 2003, Interaction with Tap42 is required for the essential function of Sit4 and type 2A phosphatases: *Mol Biol Cell*, v. 14, p. 4342-51.
- Watson, H., and J. S. Bonifacino, 2007, Direct binding to Rsp5p regulates ubiquitination-independent vacuolar transport of Sna3p: *Mol Biol Cell*, v. 18, p. 1781-9.
- Wedaman, K. P., A. Reinke, S. Anderson, J. Yates, J. M. McCaffery, and T. Powers, 2003, Tor kinases are in distinct membrane-associated protein complexes in *Saccharomyces cerevisiae*: *Mol Biol Cell*, v. 14, p. 1204-20.

- Wright, M. B., J. Ramos, M. J. Gomez, K. Moulder, M. Scherrer, G. Munson, and R. F. Gaber, 1997, Potassium transport by amino acid permeases in *Saccharomyces cerevisiae*: *J Biol Chem*, v. 272, p. 13647-52.
- Wu, N., B. Zheng, A. Shaywitz, Y. Dagon, C. Tower, G. Bellinger, C. H. Shen, J. Wen, J. Asara, T. E. McGraw, B. B. Kahn, and L. C. Cantley, 2013, AMPK-dependent degradation of TXNIP upon energy stress leads to enhanced glucose uptake via GLUT1: *Mol Cell*, v. 49, p. 1167-75.
- Wullschleger, S., R. Loewith, and M. N. Hall, 2006, TOR signaling in growth and metabolism: *Cell*, v. 124, p. 471-84.
- Xie, Z., and D. J. Klionsky, 2007, Autophagosome formation: core machinery and adaptations: *Nat Cell Biol*, v. 9, p. 1102-9.
- Xu, P., D. M. Duong, N. T. Seyfried, D. Cheng, Y. Xie, J. Robert, J. Rush, M. Hochstrasser, D. Finley, and J. Peng, 2009, Quantitative proteomics reveals the function of unconventional ubiquitin chains in proteasomal degradation: *Cell*, v. 137, p. 133-45.
- Yan, G., X. Shen, and Y. Jiang, 2006, Rapamycin activates Tap42-associated phosphatases by abrogating their association with Tor complex 1: *EMBO J*, v. 25, p. 3546-55.
- Yashiroda, H., D. Kaida, A. Toh-e, and Y. Kikuchi, 1998, The PY-motif of Bul1 protein is essential for growth of *Saccharomyces cerevisiae* under various stress conditions: *Gene*, v. 225, p. 39-46.
- Yenush, L., S. Merchan, J. Holmes, and R. Serrano, 2005, pH-responsive, posttranslational regulation of the Trk1 potassium transporter by the type 1-related Ppz1 phosphatase: *Molecular and Cellular Biology*, v. 25, p. 8683-8692.
- Yenush, L., J. M. Mulet, J. Arino, and R. Serrano, 2002, The Ppz protein phosphatases are key regulators of K⁺ and pH homeostasis: implications for salt tolerance, cell wall integrity and cell cycle progression: *Embo Journal*, v. 21, p. 920-929.
- Yu, D., J. M. Danku, I. Baxter, S. Kim, O. K. Vatamaniuk, O. Vitek, M. Ouzzani, and D. E. Salt, 2012, High-resolution genome-wide scan of genes, gene-networks and cellular systems impacting the yeast ionome: *BMC Genomics*, v. 13, p. 623.
- Yu, X., and M. Cai, 2004, The yeast dynamin-related GTPase Vps1p functions in the organization of the actin cytoskeleton via interaction with Sla1p: *J Cell Sci*, v. 117, p. 3839-53.
- Zheng, C., Z. Yan, W. Liu, and L. Jiang, 2007, Identification and characterization of a functional *Candida albicans* homolog of the *Saccharomyces cerevisiae* TCO89 gene: *FEMS Yeast Res*, v. 7, p. 558-68.
- Zheng, X. F., D. Florentino, J. Chen, G. R. Crabtree, and S. L. Schreiber, 1995, TOR kinase domains are required for two distinct functions, only one of which is inhibited by rapamycin: *Cell*, v. 82, p. 121-30.
- Zoladek, T., A. Tobiasz, G. Vaduva, M. Boguta, N. C. Martin, and A. K. Hopper, 1997, MDP1, a *Saccharomyces cerevisiae* gene involved in mitochondrial/cytoplasmic protein distribution, is identical to the ubiquitin-protein ligase gene RSP5: *Genetics*, v. 145, p. 595-603.

Anexos

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

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

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

Received 27 July 2010/Accepted 7 October 2010

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

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

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

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

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

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

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

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

∇ Published ahead of print on 15 October 2010.

TABLE 1. *Saccharomyces cerevisiae* strains

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

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

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

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

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

MATERIALS AND METHODS

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Measurements of cytosolic pH. For the determination of the cytosolic pH, a modified version of GFP referred to as ratiometric pHluorin was employed (18). The strains of interest were transformed with YYPGE15-pHluorin and grown to mid-log phase in SD medium with or without potassium supplementation (0.2 M KCl). Cells were then harvested, and cytosolic pH estimations and calibration curves were performed as previously described (6) using a PerkinElmer LS50B luminescence spectrometer equipped with FLWinLab software.

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

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

RESULTS

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

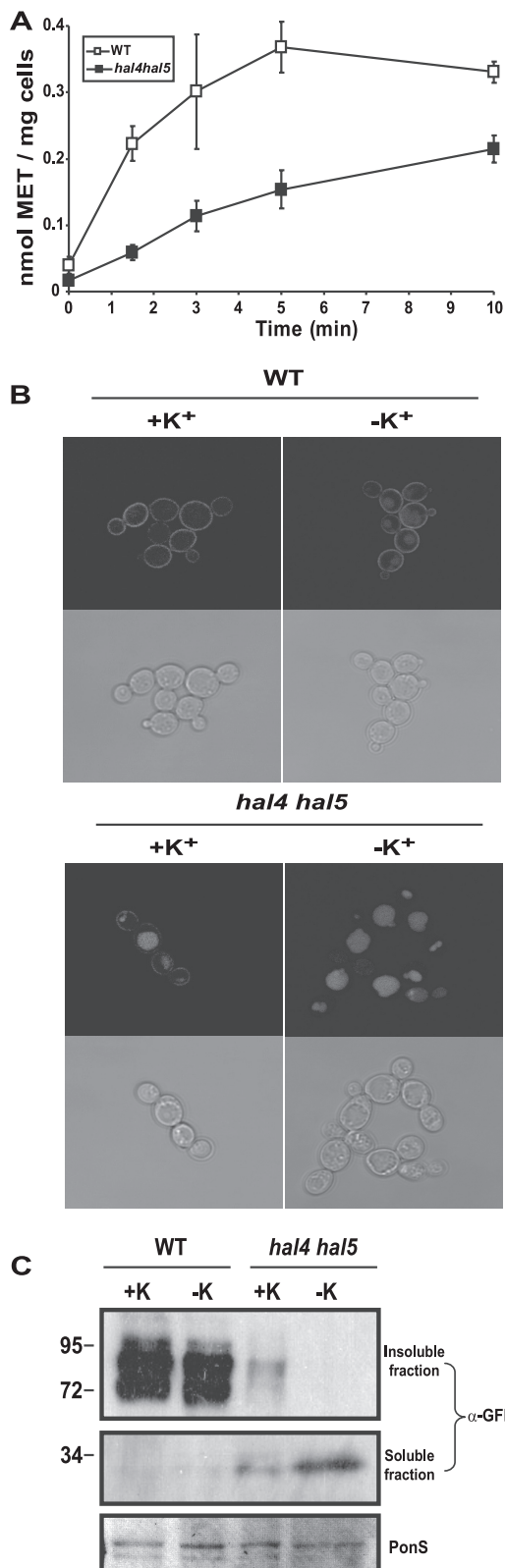


FIG. 1. Methionine uptake is reduced in the *hal4 hal5* mutant. (A) The indicated strains (W303 background) were grown to exponential phase in YPD pH 4.5 medium. Cells were harvested and used for methionine uptake assays as described in Materials and Methods. Graphs show the median value and the standard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

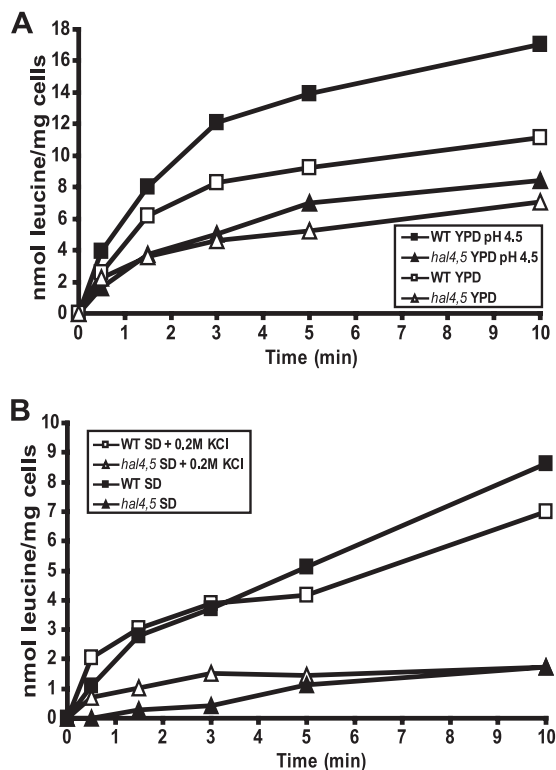


FIG. 2. Leucine uptake in the *hal4 hal5* mutant is reduced. (A) The indicated strains (BY4741 background) were grown to exponential phase. Cells were harvested and used for leucine uptake assays as described in Materials and Methods. Assays were performed with YPD pH 6.0 medium and YPD pH 4.5 medium.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

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

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

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

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

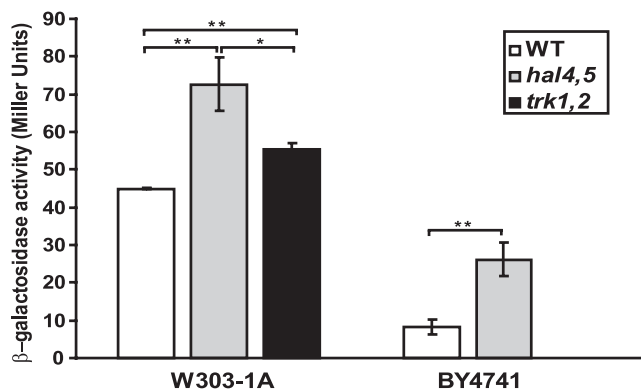


FIG. 3. GCN pathway activation in the *hal4 hal5* and *trk1 trk2* mutants. Cells of the indicated strains and background were grown in YPD medium to exponential phase and were harvested by centrifugation. β -Galactosidase activity was determined as described in Materials and Methods. Graphs show the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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

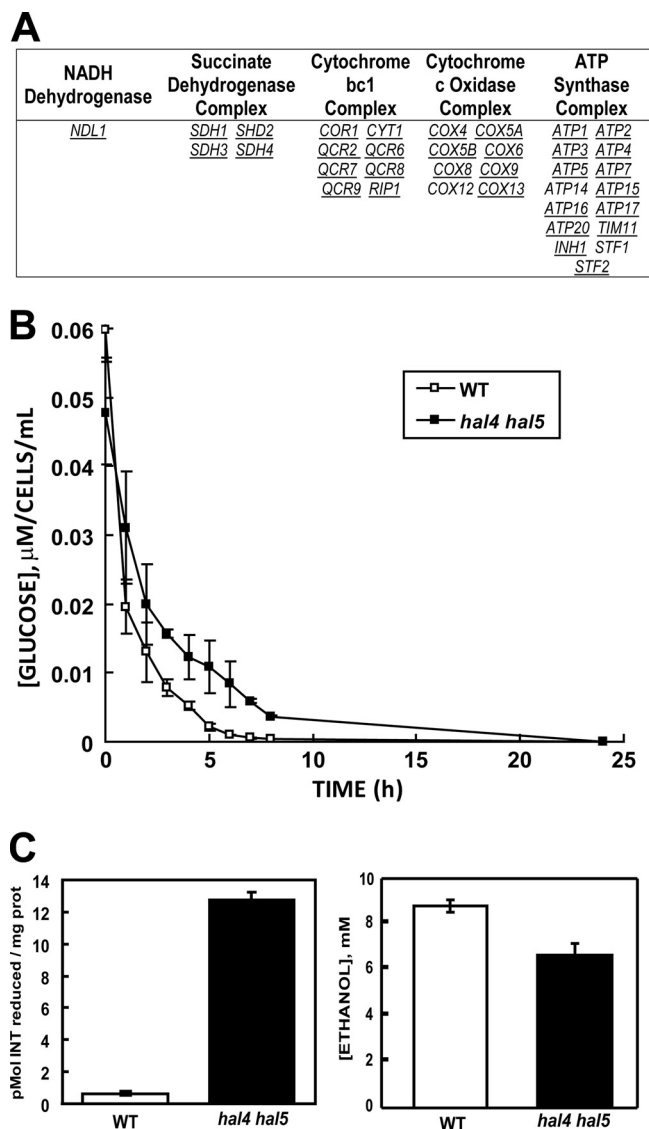


FIG. 4. Changes in energy metabolism in the *hal4 hal5* mutant. (A) Induction of genes in the *hal4 hal5* strain encoding proteins involved in the respiratory chain. Genes induced in either the W303-1A or BY4741 background are underlined. (B) The indicated strains were grown to mid-log phase in YPD pH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

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

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

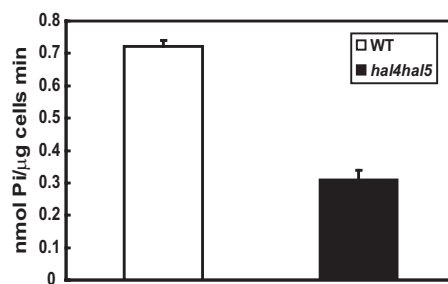


FIG. 5. Pma1 activity in the *hal4 hal5* mutant. W303-1A (WT) cells of the indicated strains were grown in YPD medium to exponential phase and were harvested by centrifugation, washed with water, and preincubated with glucose for 5 min to allow Pma1 activation prior to cell lysis. Pma1 activity was determined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

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

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

DISCUSSION

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ACKNOWLEDGMENTS

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

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

REFERENCES

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

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