

UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA
Departamento de Microbiología



**FUNCIÓN DE LOS TRANSPORTADORES DE
POTASIO EN LA HOMEOSTASIS DE CATIONES EN
LA LEVADURA *HANSENULA POLYMORPHA***

TESIS DOCTORAL

María del Carmen Álvarez Morales
Córdoba, 2013

TITULO: *Función de los transportadores de potasio en la homeostasis de cationes en la levadura Hansenula polymorpha*

AUTOR: *María del Carmen Álvarez Morales*

© Edita: Servicio de Publicaciones de la Universidad de Córdoba. 2013
Campus de Rabanales
Ctra. Nacional IV, Km. 396 A
14071 Córdoba

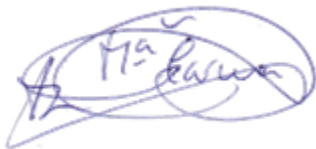
www.uco.es/publicaciones
publicaciones@uco.es

UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA
Departamento de Microbiología

FUNCIÓN DE LOS TRANSPORTADORES DE
POTASIO EN LA HOMEOSTASIS DE CATIONES EN
LA LEVADURA *HANSENULA POLYMORPHA*

Trabajo presentado por María del Carmen Álvarez Morales
para optar al grado de Doctor con Mención Internacional

La Doctoranda



María del Carmen Álvarez Morales

El Director



Dr. José Ramos Ruiz

Córdoba, 2013



TÍTULO DE LA TESIS: Función de los transportadores de potasio en la homeostasis de cationes en la levadura *Hansenula polymorpha*

DOCTORANDO/A: María del Carmen Álvarez Morales

INFORME RAZONADO DEL DIRECTOR DE LA TESIS

José Ramos Ruiz, Catedrático de Microbiología de la Universidad de Córdoba

Informa que:

El trabajo de Tesis se ha desarrollado conforme al plan de trabajo previsto. La doctoranda ha recibido formación de calidad y ha aprendido y puesto a punto una importante variedad de técnicas. En este sentido, también ha realizado dos estancias de investigación en el laboratorio de la Dr. Sychrová (Praga) en el Institute of Physiology Academy of Sciences of the Czech Republic (Department of Membrane Transport). Fruto directo del trabajo ha sido la publicación de un trabajo en la revista Fungal Genetics Biology (2012) y otro que se encuentra en preparación. Además, y en el contexto de la investigación del grupo, M.C. Álvarez ha participado en la publicación de cinco trabajos más.

Por todo ello, se autoriza la presentación de la tesis doctoral.

Córdoba, 21 de agosto de 2013

Firma del director

Fdo.: José Ramos Ruiz

A mis padres

AGRADECIMIENTOS

Gracias a todas las personas que han formado parte de esta etapa de mi vida y que de una u otra manera me han ayudado.

En primer lugar, quiero agradecer al Dr. José Ramos por ser más que un director, ser un apoyo en todo momento. Por confiar en mí y darme la oportunidad de empezar bajo su dirección en este mundo de investigación y descubrimiento. Gracias por los consejos y su inmensa paciencia en mis momentos de agobio. Por ayudarme a madurar no sólo como científica sino como persona a lo largo de estos años.

A las doctoras Hana Sychrová, por acogerme en su laboratorio en Praga y mostrarme su ayuda y confianza, y Carmen Michán, porque sus visitas fugaces y sus consejos han sido fundamentales para llegar a este punto “final”.

Gracias a mis compañeros de laboratorio. A Clara por ser guía y amiga, por tener siempre una palabra para mí. A José Luis, Rito, Ulises, Transi, Ana,... por ser compañeros inigualables, por saber hablarme en mis mañanas difíciles y estar siempre dispuestos a ayudarme. A Sam por ser el último en llegar al laboratorio pero no el último en hacerse notar. Gracias por ayudarme y sacarme una sonrisa incluso en los momentos complicados.

A Tere, gracias, por ser más que una compañera, ser una amiga y tener siempre un pensamiento positivo para mí, me has dado fuerzas. Y a todos mis compañeros del departamento. A los profesores a los que tengo un gran aprecio, a las técnicas por ser el motor del laboratorio y a Conchi porque sin ella estaría pérdida entre papeleos... gracias por tener siempre tiempo para mí.

Gracias a las que empezaron como compañeras de palas y se han convertido en amigas y confidentes de pasillos y montaditos, a Tina y Zaira, vuestro apoyo ha significado mucho para mí. A Aida, Marta y Sandra por hacerme tan fácil mi estancia en Praga, sin vosotras no hubiera sido lo mismo.

A mis amigos de toda la vida, sois muchos para nombraros pero gracias por estar a mi lado, sobretodo porque todavía muchos de vosotros no entendéis a lo que me dedico pero aun así me apoyáis.

Y finalmente gracias a los que están día a día a mi lado, mi familia. Sois lo más importante de mi vida. Las palabras se quedan cortas para describir todo lo que os agradezco. En especial...

Gracias a mis “chicos”, mis hermanos, por ser tan diferentes y tan necesarios para mí. A mi hermana, Mauisa, por ser mi decisión en mis indecisiones y mi locura en mi sensatez, y a mi hermano Juanma, porque su presencia silenciosa y su empeño sin límite son mi motivación. Gracias. A mis abuelos, a los que están y a los que ya no están por ser ejemplo de superación y entrega, y a Pepita por formar parte de mi vida.

A ti Miguel. Gracias por ser mi amigo y mi compañero en la vida. Estar a mi lado y creer en mí aun cuando yo no creía, por ser mi fuerza y mi felicidad en mis días tristes. Gracias chico por caminar a mi lado en esta etapa, por “entender” lo que hago e intentar ayudarme aun sin saber de lo que hablo. Por los largos paseos al lado de Tina, y ser tan paciente conmigo siempre.

Y por último a mis padres, a los que dedico este trabajo porque sin ellos no sería quien soy ni estaría donde estoy. Gracias porque con vuestro esfuerzo y trabajo me habéis dado la oportunidad de llegar hasta aquí. Gracias, por confiar siempre en mí y apoyarme en mis decisiones. Por creer en mí y ser mi rayito de luz en los momentos oscuros. Ser mi apoyo incondicional en lo bueno y en lo malo. Por aceptarme como soy y respetarme incluso cuando se me “cruzan los cables”. Gracias por ser como sois. Gracias por ser mis padres. Os quiero.

ÍNDICE

RESUMEN	3
SUMMARY	7
INTRODUCCIÓN	11
1. HOMEOSTASIS DE IONES EN LEVADURAS.....	12
1.1. La homeostasis de potasio y sodio en levaduras	17
1.2. La homeostasis de potasio y sodio en <i>S. cerevisiae</i>	19
1.2.1. Los transportadores de potasio Trk1 y Trk2 en <i>S. cerevisiae</i>	22
Regulación de la actividad de Trk1 y Trk2.....	24
1.3. La homeostasis de potasio y sodio en levaduras no convencionales	25
1.3.1. El transportador de potasio Hak1	29
2. LA LEVADURA <i>HANSENULA POLYMORPHA</i>	32
2.1. Filogenia.....	32
2.2. Ecología	34
2.3. Características genéticas y aplicaciones.....	35
2.4. Homeostasis de iones de potasio y sodio en <i>H. polymorpha</i>	37
OBJETIVOS	41
MATERIALES Y MÉTODOS	45
1. MATERIAL BIOLÓGICO. MICROORGANISMOS.....	45

2.	MEDIOS DE CULTIVO. CRECIMIENTO Y MANTENIMIENTO DE MICROORGANISMOS	45
2.1.	Crecimiento en medio líquido	46
2.2.	Crecimiento en medio sólido	47
3.	ANÁLISIS DEL CRECIMIENTO DE LAS CEPAS.....	47
3.1.	Tasa de crecimiento en medio líquido.....	47
3.2.	Análisis fenotípico por test goteo	47
3.3.	Análisis fenotípico por tamaño de colonias.....	48
4.	MÉTODOS DE BIOLOGÍA MOLECULAR	48
4.1.	Técnicas de extracción de ARN.....	48
4.2.	Determinación de la concentración de ácidos nucleicos.....	49
4.3.	Determinación de la expresión génica mediante PCR a tiempo real.....	49
4.4.	Cebadores	51
5.	MÉTODOS BIOQUÍMICOS	52
5.1.	Obtención de células con diferentes niveles de potasio.....	52
5.2.	Análisis del contenido interno y de los flujos de cationes alcalinos.....	52
5.2.1.	Contenido interno de cationes.....	52
5.2.2.	Entrada de cationes.....	53
5.2.3.	Cambios en los cationes extracelulares	54
5.3.	Determinación del volumen celular.....	55
5.4.	Análisis del potencial relativo de membrana.....	55
5.5.	Efecto de la glucosa sobre el pH extracelular.	56
5.6.	Diseño experimental y estadístico	57
6.	PROCEDIMIENTOS INFORMÁTICOS Y BASES DE DATOS	58

RESULTADOS	63
CAPÍTULO 1: ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO DE LAS PROTEÍNAS <i>HPHAK1</i> Y <i>HPTRK1</i>.....	63
1. Antecedentes.....	63
2. Análisis de secuencia	63
CAPÍTULO 2: CARACTERIZACIÓN DE LA FUNCIÓN DE LOS TRANSPORTADORES DE POTASIO <i>HAK1</i> Y <i>TRK1</i> EN <i>HANSENULA POLYMORPHA</i>	77
1. Análisis fenotípico de cepas carentes de sistemas de transporte de potasio.....	77
2. Contenido interno de potasio.....	82
3. Análisis de los cambios de potasio extracelular	84
4. Estudio de los flujos de entrada de Rb^+ (K^+) y determinación de los valores cinéticos de transporte	86
5. Análisis de expresión de <i>HAK1</i> y <i>TRK1</i>	90
CAPÍTULO 3: ANÁLISIS DE LA FUNCIÓN DE LOS TRANSPORTADORES DE POTASIO <i>HAK1</i> Y <i>TRK1</i> EN LA HOMEOSTASIS DE SODIO/LITIO EN <i>HANSENULA POLYMORPHA</i>	95
1. Análisis fenotípico de cepas carentes de sistemas de transporte de potasio en presencia de sales.....	95
2. Contenido interno de sodio.....	97
3. Análisis de los cambios de sodio/litio extracelular.	98
4. Estudio de los flujos de entrada de litio (sodio).....	100
5. Expresión de los genes en presencia de sodio	102
6. Estudio del papel de la calcineurina.....	105
6.1. Crecimiento en medio sólido	106
6.2. Contenido interno de cationes	107

CAPÍTULO 4: OTROS ASPECTOS EN LA CARACTERIZACIÓN DE HANSENULA	
POLYMORPHA	111
1. Crecimiento en presencia de distintas drogas catiónicas	111
2. Determinación del volumen celular	112
3. Análisis del potencial relativo de membrana.....	116
4. Efecto de la glucosa en la variación del pH extracelular	119
DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES.....	123
Discusión	123
Aportación a la homeostasis de potasio.....	124
Aportación a la homeostasis de sodio.....	127
Conclusiones	131
DISCUSSION AND CONCLUSIONS.....	135
Discussion	135
Contribution to potassium homeostasis	136
Contribution to sodium homeostasis	139
Conclusions	143
BIBLIOGRAFÍA	147
ANEXO	161

Índice de Figuras

Figura 1. Esquema de los principales sistemas proteicos implicados en el transporte de cationes descritos para la levadura modelo <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	14
Figura 2. Esquema de los principales reguladores que actúan de manera directa sobre la actividad de Trk1 y Trk2.....	24
Figura 3. Sistemas de transporte de absorción y expulsión de potasio y/o sodio de la membrana plasmática de las especies de levadura no convencionales.....	26
Figura 4. Modelo del posible mecanismo de transporte de potasio en <i>Debaryomyces hansenii</i>	31
Figura 5. Cladograma que representa las relaciones filogenéticas de diferentes especies de levaduras.....	33
Figura 6. Imágenes de <i>Hansenula polymorpha</i> al microscopio óptico (izquierda) y al microscopio electrónico de transmisión (derecha)	36
Figura 7. Placa de monitorización de la acidificación del medio.....	57
Figura 8. Alineamiento de <i>HpHak1</i> con otras proteínas relacionadas.....	67
Figura 9. Alineamiento de <i>HpTrk1</i> con otras proteínas relacionadas.....	71
Figura 10. Árbol filogenético que relaciona <i>HpHak1</i> con proteínas similares en otros organismos	72
Figura 11. Árbol filogenético que relaciona <i>HpTrk1</i> con proteínas similares en otros organismos	73

Figura 12. Árbol filogenético que relaciona las proteínas Hak1 y Trk1 de diversos organismos comparados	74
Figura 13. Comprobación del crecimiento de las cepas de <i>Hansenula polymorpha</i> , en los distintos medios y condiciones usados como control a lo largo de este trabajo	77
Figura 14. Crecimiento en presencia de distintas concentraciones de KCl	78
Figura 15. Efecto del potasio y del pH en el crecimiento de la cepa silvestre y cepas mutantes en el sistema de transporte Hak1 y Trk1	79
Figura 16. Tamaño de las colonias de las cepas de <i>Hansenula polymorpha</i> en diferentes condiciones de potasio	81
Figura 17. Contenido de potasio intracelular de la cepa NCYC495 y las cepas mutantes en el sistema de transporte Hak1 y Trk1	83
Figura 18. Contenido de potasio intracelular de las cepas de <i>Hansenula polymorpha</i> a lo largo del proceso de ayuno de potasio	84
Figura 19. Variación de potasio externo producido por las cepas de <i>Hansenula polymorpha</i>	86
Figura 20. Entrada de rubidio en las cepas	87
Figura 21. Expresión relativa de <i>HpHAK1</i> y <i>HpTRK1</i> en diferentes condiciones	91
Figura 22. Expresión relativa de <i>HpHAK1</i> y <i>HpTRK1</i> en distintas cepas y diferentes condiciones de potasio.....	92
Figura 23. Efecto del sodio y el litio en el crecimiento de las cepas de <i>H. polymorpha</i>	96
Figura 24. Crecimiento en presencia de distintas concentraciones de sodio	97

Figura 25. Contenido de potasio y sodio intracelular de la cepa NCYC 495 y las cepas mutantes en el sistema de transporte Hak1 y Trk1.....	98
Figura 26. Variación de sodio y litio externo en las cepas de <i>Hansenula polymorpha</i>	99
Figura 27. Entrada de Li ⁺ en las cepas.....	100
Figura 28. Entrada de Li ⁺ en las cepas crecidas en presencia de sodio.....	101
Figura 29. Contenido de potasio y sodio intracelular de las cepas.....	102
Figura 30. Expresión relativa de <i>HpHAK1</i> y <i>HpTRK1</i> en diferentes condiciones.....	103
Figura 31. Evolución de los niveles de transcrito de <i>HpHAK1</i> a lo largo del tiempo.....	104
Figura 32. Expresión relativa de <i>HAK1</i> y <i>TRK1</i> en presencia de NaCl de la cepa silvestre y los mutantes $\Delta hak1$ y $\Delta trk1$	105
Figura 33. Efecto del sodio/litio en el crecimiento de las cepas de <i>H. polymorpha</i> con la construcción <i>pHAK1-lacZ</i>	106
Figura 34. Contenido de sodio, litio y potasio intracelular de las cepas construidas con <i>pHAK1-lacZ</i>	107
Figura 35. Efecto de los compuestos espermina, TMA e higromicina B sobre el crecimiento de las cepas de <i>Hansenula polymorpha</i>	112
Figura 36. Ejemplo de cómo se obtienen los resultados del volumen celular a partir del software específico COULTER AccuComp 3.01 de Beckman-Coulter.....	114
Figura 37. Medida del volumen celular en las cepas de <i>H. polymorpha</i> en condición control y en ayuno de potasio.....	115

Figura 38. Medida del volumen celular en las cepas de <i>H. polymorpha</i> en condición control y en presencia de sodio	116
Figura 39. Efecto de la amiodarona sobre el potencial relativo de membrana.....	117
Figura 40. Potencial relativo de membrana de <i>H. polymorpha</i> en células normales y células ayunadas de potasio	118
Figura 41. Potencial relativo de membrana en cepas de <i>H. polymorpha</i> crecidas en condición normal y en presencia de sodio	119
Figura 42. Comparación de la acidificación del medio por las cepas de <i>Hansenula polymorpha</i>	120
Figura 43. Modelo propuesto para el mecanismo de transporte de K^+ en <i>H. polymorpha</i>	126
Figura 44. Esquema propuesto del mecanismo de transporte de Na^+ en <i>H. polymorpha</i>	129
Figure 45. Model of the mechanism proposed for K^+ transport in <i>H. polymorpha</i>	138
Figure 46. Model of the mechanism proposed for Na^+ transport in <i>H. polymorpha</i>	140

Índice de las tablas

Tabla 1. Transportadores de cationes alcalinos de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	15
Tabla 2. Visión general de los genes que codifican los sistemas de transporte activo de potasio en levaduras.....	27
Tabla 3. Relación de cepas de <i>Hansenula polymorpha</i> empleadas en este trabajo.....	45
Tabla 4. Composición de los medios utilizados	46
Tabla 5. Programa de la PCR a tiempo real	50
Tabla 6. Oligonucleótidos empleados como cebadores en las reacciones de PCR a tiempo real	51
Tabla 7. Identidad y similitud entre <i>HpHak1</i> y proteínas relacionadas	64
Tabla 8. Identidad y similitud entre <i>HpTrk1</i> y proteínas relacionadas.....	64
Tabla 9. Tamaño de las colonias de las cepas de <i>Hansenula polymorpha</i> en diferentes condiciones de potasio.....	81
Tabla 10. Constantes cinéticas del transporte de Rb^+ en las cepas silvestre y los mutantes de sistemas de transporte de potasio en ayuno de potasio	89
Tabla 11. Constantes cinéticas del transporte de Rb^+ en las cepas silvestre y los mutantes de sistemas de transporte de potasio	89

RESUMEN

RESUMEN

La homeostasis de cationes es fundamental para las células vivas. Parámetros fisiológicos de relevante importancia para la célula como son el volumen celular, el pH intracelular, el potencial de membrana o la concentración interna de cationes dependen de los sistemas de entrada y salida de los principales cationes celulares, como son el sodio y el potasio.

En este trabajo de Tesis hemos utilizado la levadura *Hansenula polymorpha* para avanzar en el estudio de la homeostasis de cationes en levaduras. *H. polymorpha* es una levadura “no convencional” de gran interés y potencial utilidad en procesos biotecnológicos. Se trata de una levadura metilotrófica y termotolerante, capaz de crecer a más de 50 °C. De igual manera que en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, *H. polymorpha* posee dos genes que participan en el transporte de potasio, pero a diferencia de lo que sucede en la levadura modelo en la que ambos genes pertenecen a la misma familia (*TRK1,2*), en *H. polymorpha* existe sólo un representante de Trk (*TRK1*) y otro gen filogenéticamente diferente, denominado *HAK1* (High-Affinity-K⁺). Utilizando mutantes en los sistemas de transporte de potasio de esta levadura, hemos caracterizado los requerimientos de potasio y la tolerancia a sal, hemos estudiado los flujos de potasio y sodio y asimismo hemos identificado algunos procesos implicados en su regulación.

Los resultados de este trabajo mostraron que la disrupción de alguno de los genes, *HAK1* o *TRK1*, condujo a un crecimiento defectuoso a concentraciones bajas de potasio, siendo este hecho especialmente relevante en el caso de la disrupción de *HAK1*. Los ensayos de flujo de Rb⁺, como catión análogo al K⁺, demostraron que el transportador Hak1 tiene una alta afinidad de absorción, mientras que la afinidad estimada para Trk1 fue varias veces inferior. Además, se concluyó que la expresión de *HAK1* se induce en condiciones limitantes de K⁺ y

está regulada por la presencia de K^+ , mientras que *TRK1* no se regula transcripcionalmente.

Con respecto al transporte de sodio, se ha demostrado que no hay un transporte específico de alta afinidad para este catión. Las cepas carentes del transportador *Trk1* tienen una mayor sensibilidad a cationes tóxicos, acumulan mayor cantidad, transportan más rápido dichos cationes y manifiestan una mayor expresión del gen *HAK1*. Utilizando mutantes en calcineurina se ha demostrado que esta proteína fosfatasa juega un papel en la regulación de estos procesos. Los resultados sugieren que *Hak1* funciona como un transportador de sodio (litio) en determinadas condiciones, y proponemos que *TRK1* posee un papel fundamental en la tolerancia a sal actuando de forma indirecta a través de *HAK1*, lo que coincide con la idea de que los transportadores *Trk* pueden tener funciones adicionales a la de transportar potasio.

Por último, cabe mencionar que por primera vez se han obtenido medidas del potencial relativo de membrana en *H. polymorpha*. En contra de lo publicado para la levadura modelo *S. cerevisiae*, la delección o disrupción de los genes de transporte o el ayuno de potasio produce una despolarización celular que puede estar relacionado con la capacidad de acidificación del medio de estas levaduras. Este comportamiento plantea interrogantes de interés que han quedado pendientes de explicación en un futuro.

SUMMARY

SUMMARY

Cation homeostasis is essential for living cells. Important physiological parameters for the cell such as cell volume, intracellular pH, membrane potential or the internal cation concentration are affected by the influx and efflux systems of potassium and sodium alkali cations.

In this work we have used *Hansenula polymorpha* to advance in the study of cation homeostasis in yeast. *H. polymorpha* is a methylotrophic thermotolerant non-conventional yeast. The increasing interest on this organism is based on the great diversity of areas in which it can be useful, for example in the field of industrial microbiology. Unlike what happens in the model yeast *Saccharomyces cerevisiae*, in which the two genes involved in potassium transport belong to the same family of transporters (*TRK1,2*), in *H. polymorpha* there is only one representative of Trk (*TRK1*) and another phylogenetically different gene, called *HAK1* (High-Affinity-K⁺). Using mutants in the potassium transport systems of this yeast, we have characterized the potassium requirements and salt tolerance, we have studied the potassium and sodium fluxes and we have also identified some processes involved in their regulation.

The results of this study showed that the disruption of any of the genes, *TRK1* or *HAK1*, led to an impaired growth at low potassium concentrations, being this fact particularly important in the case of the disruption of *HAK1*. The Rb⁺ (K⁺) uptake rates showed high affinity of Hak1 for K⁺, while the affinity estimated for Trk1 was several orders of magnitude lower. Furthermore it was concluded that *HAK1* expression is induced at limiting-K⁺ conditions and is regulated by the presence of K⁺, while *TRK1* is not regulated transcriptionally.

With respect to sodium transport, it has been demonstrated that there is no specific high-affinity transport for this cation. When compared to wild type, strains lacking Trk1 transporter have a greater sensitivity to sodium and lithium, accumulate higher amounts of these cations during growth, have a faster transport

of these cations and exhibit increased *HAK1* expression. Using calcineurin mutants, we have demonstrated that this phosphatase protein plays a role in the regulation of these processes. The results suggest that Hak1 functions as a sodium (lithium) transporter under certain conditions, and we propose that *TRK1* has a fundamental role in salt tolerance acting directly or indirectly through *HAK1*. This idea is in agreement with the proposal that Trk transporters may have additional functions to potassium transport.

Finally, it is worth mentioning that for the first time the relative plasma-membrane potential was measured in *H. polymorpha*. Contrary to what is published for the model yeast *S. cerevisiae*, disruption of transport genes or K⁺-starvation generates a cellular depolarization that can be related to the medium acidification capacity of these yeasts. This behavior produces interesting questions that remained open for future research.

INTRODUCCIÓN

1. HOMEOSTASIS DE IONES EN LEVADURAS

2. LA LEVADURA *HANSENULA POLYMORPHA*

Las levaduras son células eucariotas simples, que se han convertido en modelo importante para el estudio de numerosos aspectos fundamentales de la biología celular eucariota ya que aportan numerosas ventajas experimentales. Se trata de organismos unicelulares, fáciles de manipular, baratos de obtener y cultivar, tienen una alta velocidad de generación, sin olvidar su fácil manipulación genética (Goffeau *et al.*, 1996; Botstein *et al.*, 1997). Las levaduras prosperan típicamente en hábitats con azúcares, tales como frutos, flores y cortezas de los árboles. Un buen número de ellas vive como simbiote de animales, especialmente insectos y algunas son patógenas para plantas y animales, incluido el hombre.

Las levaduras se usan actualmente en diferentes procesos industriales como en la elaboración de vino o cerveza, en la industria panadera o en la producción de una gran variedad de productos bioquímicos como por ejemplo en la obtención de etanol. Además, éstas también son responsables del deterioro de alimentos y bebidas, y algunas otras presentan interés desde el punto de vista médico por ejemplo en la producción de antibióticos (Boekhout y Kurtzman, 1996; Wolf, 1996; Boekhout y Robert, 2003).

Saccharomyces cerevisiae es la levadura modelo por excelencia sobre la que se han centrado la mayor parte de los recursos e investigaciones llevadas a cabo. Sin embargo, existen una gran variedad de levaduras que hoy en día están demostrando ser de gran interés por las diversas propiedades que presentan y confieren ciertas ventajas significativas frente a *S. cerevisiae*. De hecho, estas levaduras denominadas no convencionales, se utilizan actualmente en el estudio y la producción de polisacáridos, aditivos alimentarios, combustibles, productos químicos y, más recientemente, productos de interés farmacéutico y terapéutico (Wolf, 1996; Flores *et al.*, 2000; Wolf *et al.*, 2003).

El interés, cada vez más creciente, del uso de las levaduras no convencionales promovido por los continuos avances en áreas como la ingeniería genética y la bioinformática está permitiendo que se avance en el estudio de las bases fisiológicas y bioquímicas de estas levaduras, de las que se dispone escasa

información en comparación con la levadura modelo *S. cerevisiae* (Flores *et al.*, 2000). Es el caso por ejemplo de la levadura de fisión *Schizosaccharomyces pombe* que es actualmente la especie más utilizada en estudios sobre ciclo celular y morfogénesis y se está convirtiendo en el modelo a utilizar en este campo, más aún desde que su genoma fue totalmente secuenciado (Wood *et al.*, 2002). Este interés de conocimiento promueve no solo el avance en el estudio de las levaduras sino también en el descubrimiento de las mismas.

1. HOMEOSTASIS DE IONES EN LEVADURAS

La importancia de los cationes metálicos alcalinos en la fisiología celular, incluyendo su transporte dentro y fuera de la célula, ha sido de gran interés científico desde hace más de 100 años. Muy pronto se descubrió que, mientras que el potasio es altamente acumulado en diferentes tipos de células vivas y es indispensable para muchas funciones fisiológicas, el sodio es tóxico y en concentraciones más altas se vuelve letal.

Desde hace más de 50 años, las células de levaduras, entre otros tipos de células, se han desarrollado como un modelo ideal para estudiar el transporte y la homeostasis de cationes alcalinos, ya que una de las características que tienen es la capacidad de adaptarse con éxito a una variedad de perturbaciones ambientales, incluyendo iónica, osmótica y el estrés por pH (Rodríguez-Navarro A, 2000; Hohmann S, 2002; Peñalva y Arst, 2002; Eddy y Barnett, 2007). Todos estos estreses tienen un impacto importante en las concentraciones intracelulares de K^+/Na^+ y otros parámetros fisiológicos importantes de la célula, tales como el volumen celular, el potencial de membrana plasmática y el pH intracelular (Jennings, 1995). Estos parámetros fisiológicos son fundamentales para el correcto funcionamiento de los procesos celulares, tales como la progresión del ciclo celular y la síntesis de proteínas y, a menudo, están vinculados entre sí (Ariño *et al.*, 2010). Por ejemplo, el volumen celular determina la concentración de moléculas,

incluyendo K^+ , Na^+ y H^+ ; y los niveles de potasio y sodio intracelular y extracelular tienen un gran impacto sobre el pH intracelular, el potencial de membrana plasmática y las actividades enzimáticas (Almagro *et al.*, 2001). Por lo tanto una de las propiedades fundamentales de todas las células es la homeostasis de iones, manteniendo los niveles de estos parámetros dentro de un rango óptimo para los sistemas celulares. Esto se logra a través de los transportadores de iones y sus sistemas de regulación, enzimas reguladoras, las vías de señalización celular y el metabolismo celular (Ariño *et al.*, 2010).

Las levaduras son capaces de crecer en un amplio intervalo de concentraciones externas de K^+ (10 μ M a 2,5 M) y Na^+ (<1,5 M), y algunas especies de levaduras no convencionales halotolerantes pueden crecer incluso en soluciones salinas casi saturadas. Aunque la mayoría de las levaduras normalmente no necesitan elevadas concentraciones de sodio para vivir, éstas suelen enfrentarse a situaciones en las que la cantidad de sodio (tóxico) en el medio ambiente es mucho mayor respecto al potasio requerido. En estas circunstancias las células consumen una gran cantidad de energía acumulando la suficiente cantidad intracelular de potasio y manteniendo baja la concentración de sodio citosólico.

Para mantener una concentración intracelular óptima de los iones de potasio y un estable y alto ratio intracelular K^+/Na^+ , las células de levadura emplean tres posibles mecanismos (Rodríguez-Navarro, 2000; Ariño *et al.*, 2010):

- Discriminación estricta entre los cationes alcalinos en el transporte a nivel de membrana plasmática, es decir, transportadores que muestran una mayor afinidad por el transporte de potasio que del sodio.
- Alta eficiencia de expulsión de cationes tóxicos o que se encuentren en exceso en el interior celular.
- Secuestro selectivo, compartimentalización de cationes en orgánulos intracelulares.

Todo ello se lleva a cabo ya que en las células de levadura existen sistemas de transporte tanto en la membrana plasmática como en la membrana de los orgánulos, que median los flujos de cationes alcalinos con diferencias en la especificidad por el sustrato y usando diversos mecanismos, como por ejemplo ATPasas de intercambio de cationes, sistemas de simporte o antiporte activo, y transporte pasivo a través de canales (Figura 1).

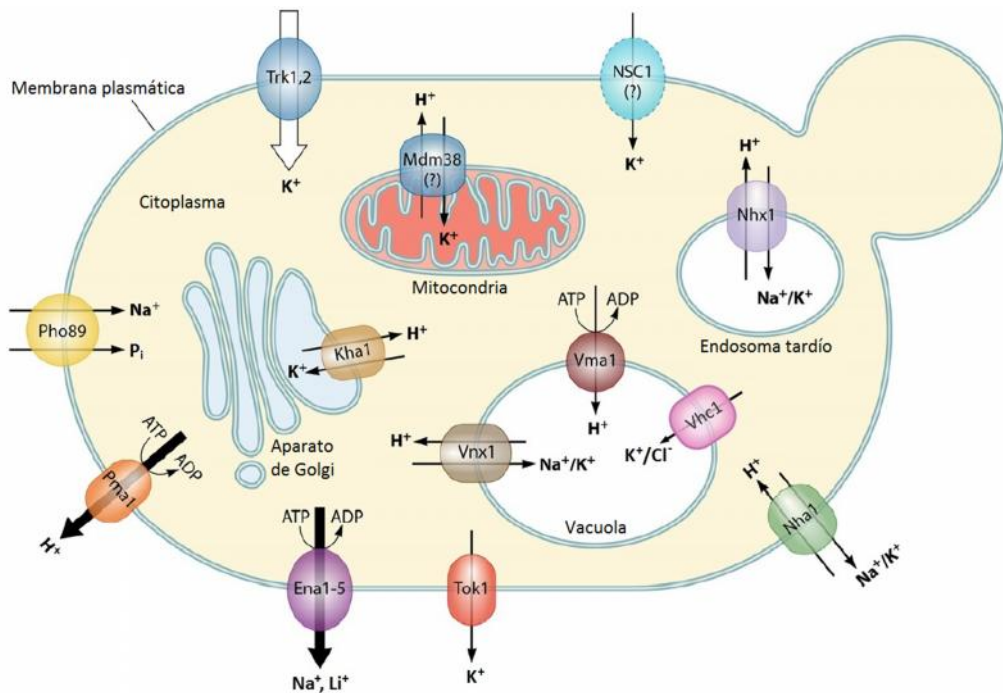


Figura 1. Esquema de los principales sistemas proteicos implicados en el transporte de cationes descritos para la levadura modelo *Saccharomyces cerevisiae*. Adaptado de Ariño *et al.*, 2010.

Hasta hoy han sido caracterizados más de diez transportadores de cationes alcalinos específicos en *S. cerevisiae* (Tabla 1) y existe una fuerte evidencia a pensar que algunos transportadores adicionales, que han sido demostrados experimentalmente, pronto se definirán a nivel molecular (Ariño *et al.*, 2010; Petrezselyova *et al.*, 2013).

Tabla 1. Transportadores de cationes alcalinos de *Saccharomyces cerevisiae*. Adaptado de Ariño *et al.*, 2010

Nombre	Localización ^a	Tipo de transportador	Sustrato específico ^b	Función principal
Trk1	MP	Uniportador	K⁺ , Rb ⁺	Entrada de K ⁺
Trk2	MP	Uniportador	K⁺ , Rb ⁺	Entrada de K ⁺
Tok1	MP	Canal	K⁺	Salida de potasio
Ena1	MP	ATPasa	Na⁺ , Li⁺ , K ⁺ , Rb ⁺	Detoxificación
Nha1	MP	Antiportador	K⁺ , Na⁺ , Li ⁺ , Rb ⁺	Salida de potasio
Pho89	MP	Simportador	Na⁺ , P_i	Entrada de P _i
NSC1	MP	Canal	Cationes mono/bivalentes	Desconocida
Kha1	CG	Antiportador	<i>K⁺</i> , <i>Li⁺</i> , <i>Na⁺</i>	Detoxificación
Nhx1	ET	Antiportador	Na⁺ , Rb ⁺ , <i>K⁺</i> , <i>Li⁺</i>	Detoxificación, tráfico de vesículas
Vnx1	VAC	Antiportador	Na⁺ , K⁺	Detoxificación
Vhc1	VAC	Simportador	K⁺ , Cl⁻	Detoxificación

^a MP, membrana plasmática; CG, complejo de Golgi; ET, endosoma tardío; VAC, vacuola.

^b Negrita, sustrato preferido; Cursiva, sustrato predicho mediante observación fenotípica

Muchas de las proteínas enumeradas anteriormente participan en el transporte de cationes mediante un mecanismo antiporte, un intercambio de cationes alcalinos por protones a través de las membranas, que sirve como fuente de energía para bombear cationes en contra de sus gradientes. Sin embargo, en algunos casos (por ejemplo, la alcalinización repentina del citosol a alto pH externo), las células pueden utilizar el gradiente de potasio a través de la membrana plasmática hacia el exterior como una fuerza propulsora para el transporte de protones en contra de su gradiente (Bañuelos *et al.*, 1998). Las ATPasas de las vacuolas y de la membrana plasmática (transportadores activos primarios) son las encargadas de acumular el gradiente de protones necesario para que funcionen los antiportadores activos secundarios localizados en la

membrana plasmática y de los orgánulos. Estas H⁺-ATPasas colaboran conjuntamente en el mantenimiento de la homeostasis del pH citosólico, de hecho hay evidencias de que son funcionalmente interdependientes y que están reguladas coordinándose en múltiples niveles (Martínez-Muñoz y Kane, 2008).

En las células de levadura, la H⁺-ATPasa codificada por el gen *PMA1* es la proteína más abundante en la membrana plasmática. Es muy estable y consume al menos el 20% del ATP celular (Morsomme *et al.*, 2000; Ambesi *et al.*, 2000). A través de su actividad electrogénica crea el gradiente electroquímico de protones indispensable para la funcionalidad de los antiportadores y simportadores activos secundarios. Su actividad está fuertemente regulada por el metabolismo y las condiciones fisiológicas de las células. Por ejemplo, su actividad está regulada positivamente en respuesta a la presencia de glucosa externa, a la disminución del pH intracelular o al aumento de la captación de potasio (Serrano, 1983; Seto-Young y Perlin, 1991). Además, *S. cerevisiae* posee una segunda H⁺-ATPasa de la membrana plasmática, Pma2, la cual no es esencial y con un impacto menor en la homeostasis de cationes (Schlessler *et al.*, 1988).

Respecto a la ATPasa vacuolar de las levaduras (codificada por el gen *VMA1* en el caso de *S. cerevisiae*), cabe mencionar que ésta juega un papel crucial en la acidificación del lumen de las vacuolas y es indispensable para el buen funcionamiento de otros orgánulos, donde puede existir en distintas formas y bajo regulación selectiva (Samarao *et al.*, 2009; Saroussi y Nelson, 2009). Toda la información de la que se dispone hasta ahora parece indicar que, su actividad crea el gradiente de protones a través de las membranas de los orgánulos que, a su vez, media la función de los antiportadores (catión/H⁺) de los orgánulos (Martínez-Muñoz y Kane, 2008).

1.1. La homeostasis de potasio y sodio en levaduras

La homeostasis iónica es un proceso fundamental para todos los seres vivos y en este sentido el potasio es el catión más abundante en el interior de las células vivas, cuya concentración puede variar entre 100-500 mM en las levaduras. El potasio está implicado en diversos parámetros fisiológicos, tales como turgor, potencial de membrana, fuerza iónica o pH intracelular, y se acumula en contra de gradientes, gracias a la actividad de diversos sistemas de transporte. Por el contrario, las concentraciones de sodio, el catión más abundante en la mayoría de ambientes naturales, son entre uno y dos órdenes de magnitud inferiores que las del potasio. De esta manera, la presencia de elevadas concentraciones de sodio en el medio es un factor de estrés para la mayoría de seres vivos, que se intoxican debido a la acumulación de este catión (Serrano *et al.*, 1999). Recientemente se ha descrito que la levadura halófila y xerófila *Wallemia ichthyophaga*, la cual es metabólicamente activa a concentraciones de NaCl saturadas y cuyo genoma se está secuenciando actualmente, podría ser la primera levadura que requiere alto sodio para crecer (comunicación oral).

Todas las células vivas son metabólicamente dependientes de una alta concentración intracelular de potasio (~150 mM), y para ello emplean fundamentalmente dos estrategias diferentes para mantener esta alta concentración interna de potasio en contra de las bajas concentraciones externas presentes (<10 mM). En las células animales, la absorción de potasio está acoplada químicamente a la expulsión de iones de sodio impulsada por ATP, y la difusión de iones de K⁺ hacia concentraciones externas de 1-10 mM determina un voltaje de membrana en reposo de -70 a -90 mV. Por el contrario, la mayoría de las células vegetales, hongos, y bacterias poseen una bomba de protones de extrusión fuertemente electrogénica, y los flujos de entrada de potasio son impulsados por el voltaje de la membrana, que puede ir más allá de los -300 mV (Slayman y Sanders, 1985; Blatt y Slayman, 1987)

Por lo menos cuatro modos de absorción de K^+ se producen en estas células: i) difusión rápida a través de canales específicos de potasio (Schroeder, 1988; Lebaudy *et al.*, 2007), ii) facilitación simple o difusión facilitada: un flujo lento mediado por una proteína; iii) transporte activo secundario: H^+ o Na^+ acoplado al simporte de iones de potasio (Rodríguez-Navarro *et al.*, 1986; Maathuis y Sanders, 1994; Rubio *et al.*, 1995; Rodríguez-Navarro y Rubio, 2006; Ariño *et al.*, 2010); y iv) en algunas especies, el ATP-acoplado a la bomba de entrada de K^+ (de Souza y Gomes, 1998; Benito *et al.*, 2004). Los modos ii y iii se han atribuido a dos grandes clases distintas de proteínas de transporte generalmente denominadas Trk y Kup en bacterias, y Trk (o Hkt) y Hak en plantas y hongos (Rivetta *et al.*, 2013)

En las células de levadura se mantiene un alto contenido de potasio gracias al equilibrio del flujo de entrada y salida del catión a través de la membrana plasmática necesario para las funciones fisiológicas básicas (Ortega y Rodríguez-Navarro, 1985; Lapathitis y Kotyk, 1998). Este es el caso del mantenimiento del potencial a través de la membrana plasmática, donde la ausencia de sistemas de entrada de potasio puede producir una hiperpolarización de la membrana, mientras que la delección de sistemas de transporte de salida puede dar lugar a una despolarización de la misma (Madrid *et al.*, 1998; Kinclova-Zimmermannova *et al.*, 2006; Marešová *et al.*, 2006).

La electronegatividad dentro de la célula debe permanecer en equilibrio, es por ello que cuando el ratio extracelular Na^+/K^+ excede aproximadamente hasta 700:1 y cantidades significativamente altas de sodio entran en la célula, deben salir cantidades equivalentes de potasio para mantener dicha electronegatividad. La levadura *S. cerevisiae*, cuando crece en condiciones estándar donde las cantidades de sodio son insignificantes, presenta una concentración intracelular de potasio de 200 a 300 mM (dependiendo del medio y de la cepa) y esta concentración decrece con la entrada de sodio a la célula. El crecimiento de la célula puede verse inhibido conforme la concentración interna de sodio se aproxime a la del potasio, llegando a provocar este aumento en la concentración

de Na⁺ la propia muerte celular (Rodríguez-Navarro y Ramos, 1984; Murguía *et al.*, 1996). Es por ello que tanto los organismos procariotas como los eucariotas han desarrollado sistemas eficaces para la acumulación de potasio y expulsión de sodio, con el fin de mantener los gradientes de K⁺/Na⁺ estables a través de la membrana (Bakker, 1992).

1.2. La homeostasis de potasio y sodio en *S. cerevisiae*

Saccharomyces cerevisiae está considerada como la levadura modelo por excelencia y existe gran cantidad de información sobre este organismo. Fue en la década de los 50 cuándo por primera vez se publicaron los primeros trabajos relativos al estudio del transporte de potasio en *S. cerevisiae* de la mano de Conway y O'Malley (1946) por un lado, y de Rothstein y Enns (1946) por otro. Estos autores demostraron que en la levadura, el potasio se transportaba gracias al intercambio de protones, y propusieron por primera vez: la existencia de un transportador de la membrana plasmática que poseía una mayor afinidad por el potasio que por otros cationes (Conway y Duggan, 1958); el efecto del pH externo sobre la capacidad de las células de levaduras para diferenciar entre K⁺ y Na⁺ (Armstrong y Rothstein, 1964); la inhibición competitiva de la captación de potasio por otros cationes alcalinos; y además, presentaron el primer modelo representativo de la cinética de inhibición (Armstrong y Rothstein, 1967).

Hoy en día, es mucha la información de la que se dispone sobre la homeostasis de potasio en la levadura modelo. Se sabe que los dos sistemas específicos en el transporte de potasio en *S. cerevisiae* están codificados por los genes *TRK1* y *TRK2*, los cuales están muy regulados y pueden funcionar con alta o baja afinidad, Trk1 y Trk2 respectivamente (Ko y Gaber, 1991; Calero *et al.*, 2000; Bertl *et al.*, 2003; Michel *et al.*, 2006). Además, sabemos que en ausencia de ambos transportadores Trk, existe un mecanismo de transporte no específico, que aún no está plenamente caracterizado, y en el que están implicados por un lado transportadores de otros sustratos (aminoácidos, azúcares) (Madrid *et al.*, 1998) y

por otro lado, un canal no específico de cationes denominado NSC1, cuyo gen no ha sido aún identificado (Bihler *et al.*, 1998).

Respecto al sodio, se ha demostrado que no hay un transportador específico para la entrada de sodio en la levadura *S. cerevisiae*, de hecho el sodio sólo entra en la célula de forma significativa cuando hay una alta concentración externa del mismo. Esta idea fue aceptada cuando Conway y Duggan (1958), y Armstrong y Rothstein (1964) propusieron que existen transportadores de cationes, diferentes a los cationes alcalinos, y se reforzó la idea cuando se demostró que el sodio se une al sitio de activación de los transportadores de potasio, afectando así al transporte de Rb^+ y K^+ (Borst-Pauwels, 1981). De esta forma el sodio es capaz de inhibir eficazmente la absorción de potasio al interior celular en las cepas silvestres, y por lo tanto Trk1 acepta y transporta Na^+ , además de K^+ , aunque con una afinidad mucho menor (Ramos *et al.*, 1985). Por otro lado se ha demostrado que en ausencia de Trk1, el transportador Trk2 acumula más Na^+ y menos K^+ , lo que sugiere que los transportadores de baja afinidad no capaces de discriminar entre K^+ y Na^+ (Gómez *et al.*, 1996). A este respecto, es importante señalar que, en ausencia de calcio, el canal NSC1, mencionado anteriormente, también transporta sodio o litio (Bihler *et al.*, 1998). Se ha comprobado que el sodio permite recuperar el volumen de la célula, el pH celular y el crecimiento cuando el potasio es limitante. También se ha identificado el gen *PHO89* que codifica una proteína que lleva a cabo el simporte Na^+/P_i . La transcripción de este gen está restringida a condiciones de P_i limitante y la actividad de la proteína depende del pH alcalino y de la presencia de sodio en el medio (Martínez y Persson, 1998; Pattison-Granberg y Persson, 2000).

Por otro lado, la existencia de procesos implicados en la expulsión de potasio en *S. cerevisiae* es evidente desde hace mucho tiempo. Actualmente, existe una fuerte evidencia experimental de que al menos tres transportadores distintos pueden contribuir a la expulsión de potasio de la célula, dependiendo de las condiciones fisiológicas. Dos de ellos, Ena1 y Nha1, fueron identificados en un primer momento como sistemas de expulsión de sodio, pero se ha demostrado que

éstos son capaces también de llevar a cabo un intercambio de K^+/H^+ (Bañuelos *et al.*, 1998, Benito *et al.*, 2002; Kinclova-Zimmermannova *et al.*, 2006; Ruiz y Ariño, 2007). El tercer transportador, denominado Tok1, es el único sistema de expulsión específico para el potasio existente de *S. cerevisiae* (Ketchum *et al.*, 1995; Marešová *et al.*, 2006). Se ha propuesto que en determinadas condiciones el transportador Tok1 podría mediar en la entrada de potasio a la célula. Tok1 puede considerarse como el primer miembro de una familia de canales selectivos dependientes del voltaje para el potasio, ya que en determinadas condiciones puede transportar potasio del exterior al interior de las células, esto se ha demostrado en los mutantes *trk1trk2* donde la expresión constitutiva del gen aumenta la acumulación de potasio de la célula (Fairman *et al.*, 1999).

Al mismo tiempo, las células de *S. cerevisiae* utilizan dos tipos de sistemas de expulsión de su membrana plasmática para mantener una baja concentración citosólica de cationes tóxicos (sodio o litio), codificados por los genes *ENA* y *NHA1*. Estos sistemas se complementan entre sí en la detoxificación, pero se diferencian tanto en el mecanismo de transporte como en la regulación de su expresión y su actividad (Ariño *et al.*, 2010). Los genes *ENA* codifican ATPasas que, además de expulsar de forma efectiva el sodio y litio de la célula, también pueden implicarse en la salida de potasio de la misma (Benito *et al.*, 2002). La levadura *S. cerevisiae* contiene diversas copias de genes que codifican proteínas Ena muy similares. El número de copias varía en función de la cepa, de una a cinco copias (Haro *et al.*, 1991; Garcíadeblas *et al.*, 1993). El grupo *ENA* (particularmente *ENA1*) es un factor determinante para la tolerancia a sodio de *S. cerevisiae*. La expresión de *ENA1* es inducida por sodio, litio y pH alcalino, y está regulado por la calcineurina. Su delección provoca una alta sensibilidad a los cationes sodio y litio y un crecimiento deficiente a pH alcalino, mientras que la expresión de *ENA1* restaura la tolerancia a estos cationes (Haro *et al.*, 1991; Mendoza *et al.*, 1994; Hirata *et al.*, 1995; Mendizabal *et al.*, 2001; Platara *et al.*, 2006). Por otro lado, *NHA1* codifica un antiportador Na^+/H^+ que contribuye a la detoxificación de Na^+ y Li^+ de manera significativa aunque no crucial y que, a su vez, puede estar implicado también en la expulsión de potasio de la célula (Bañuelos *et al.*, 1998; Kinclova-Zimmermannova

et al., 2006). Cuando el pH del citoplasma se eleva, Nha1 contribuye en el tamponamiento del citosol utilizando la salida de Na^+ o K^+ para tomar protones. Al contrario de lo que ocurre con *ENA1*, *NHA1* presenta una transcripción constitutiva muy baja que no se induce por sales, cambios del pH o shock osmótico, lo que sugiere que Nha1 tiene una función de “limpieza” en la homeostasis de potasio y pH intracelular. Además, se ha demostrado que, Nha1 participa en otros procesos celulares como, por ejemplo, en la regulación del ciclo celular, el volumen celular o el potencial de membrana (Ariño *et al.*, 2010).

1.2.1. Los transportadores de potasio Trk1 y Trk2 en *S. cerevisiae*

La biología molecular del transporte de potasio en levaduras se ha desarrollado rápidamente desde que en la década de los 90 se publicó la existencia de un proceso de transporte de potasio con alta afinidad y la obtención del primer mutante para dicho transporte (Rodríguez-Navarro y Ramos, 1984; Ramos *et al.*, 1985). Gaber y sus colaboradores fueron los primeros en publicar en una serie de artículos relacionados, la identificación y caracterización de los genes que codifican los dos transportadores principales involucrados en la absorción de potasio en *S. cerevisiae*, los genes *TRK1* y *TRK2*, cuyo nombre se asignó a partir del acrónimo de su función en inglés (“TRansport of K”) (Gaber *et al.*, 1988; Ko *et al.*, 1990; Ko *et al.*, 1991).

TRK1 fue el primer gen aislado y estudiado, de un transportador de potasio de una célula eucariota no animal. Se ha demostrado que el gen *TRK1* no es esencial en *S. cerevisiae* ya que las cepas que carecen de este gen pueden crecer, aunque para ello necesitan altas concentraciones de K^+ en el medio como consecuencia de su capacidad reducida de transporte para este catión (Gaber *et al.*, 1988). En una cepa silvestre, la mayor parte del transporte de potasio es llevado a cabo por Trk1, el cual puede actuar como un transportador de baja o alta afinidad dependiendo del crecimiento y estado de la célula. Cuando las células crecen en condiciones no limitantes de potasio el transportador Trk1 funciona con baja afinidad, pero tras un período de ayuno de potasio o en condiciones de potasio

limitado el transportador se activa y funciona con alta afinidad por dicho catión (Rodríguez-Navarro y Ramos, 1984; Gaber *et al.*, 1988).

Trk2 también transporta potasio con una afinidad media/alta por el catión. En comparación con el gen *TRK1*, *TRK2* se expresa de forma muy pobre en condiciones estándar, y su actividad queda enmascarada por la presencia de *TRK1*. Trk2 tiene un papel secundario en el transporte de K⁺, a pesar de que ambos sistemas Trk presentan afinidades similares por el potasio (K_m= 20 – 50 μM) y por el rubidio (K_m= 0,1 – 0,3 mM), y su mutación prácticamente no tiene fenotipo en una cepa silvestre de *S. cerevisiae*. El efecto de la mutación de *TRK2* es únicamente observable en cepas carentes de su homólogo *TRK1* (Ramos *et al.*, 1994; Rodríguez-Navarro, 2000).

Las proteínas Trk1 y Trk2 son idénticas en un 55 % de su secuencia y ambas muestran una estructura con 8 dominios transmembrana y 4 dominios MPM (membrana-poro-membrana). El gen *TRK1* codifica una proteína de 1235 aminoácidos mientras que el gen *TRK2* codifica una proteína más corta, de 889 aminoácidos (Gaber *et al.*, 1988; Ko *et al.*, 1991). Por último, cabe destacar que, sorprendentemente la mayoría de genes *TRK* identificados hasta ahora en otras levaduras son más similares a *TRK2* que a *TRK1* (Ariño *et al.*, 2010) y que, se ha identificado una función secundaria de los transportadores Trk, los cuales pueden participar también en la expulsión de cloruro (Bihler *et al.* 1999; Kuroda *et al.*, 2004).

Se ha demostrado además que, en aquellas cepas que carecen de los dos transportadores de potasio Trk, es evidente un proceso ectópico de potasio. Este proceso Trk-independiente aún no ha sido caracterizado completamente pero muestra una entrada de baja afinidad por el catión (K_m en el rango mM) debido a una hiperpolarización de la membrana, que también produce una mayor captación de otros cationes como Na⁺ y Li⁺. De hecho, la entrada de K⁺ a través de Trk1 y Trk2 podría intervenir previniendo una excesiva polarización de la membrana frente a cambios externos de pH (Madrid *et al.*, 1998).

Regulación de la actividad de Trk1 y Trk2

La regulación de la actividad del sistema Trk afecta a la concentración intracelular de potasio y a la turgencia de las células (Merchan *et al.*, 2004), al potencial eléctrico de membrana (Mulet *et al.*, 1999), y al pH intracelular (Yenush *et al.*, 2002). Estudios genéticos llevados a cabo en levadura han identificado varias proteínas implicadas en la regulación del transporte de potasio (Figura 2).

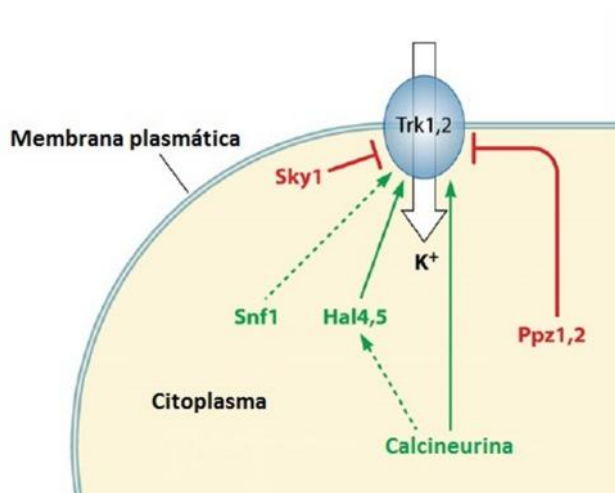


Figura 2. Esquema de los principales reguladores que actúan de manera directa sobre la actividad de Trk1 y Trk2. Adaptado de Ariño *et al.*, 2010.

La actividad de los transportadores Trk1 y Trk2 está regulada positivamente por: las proteínas quinasas Hal4 y Hal5 (Pérez-Valle *et al.*, 2007, 2010); la fosfatasa Cnb1 (calcineurina), que ha sido descrita como necesaria para la activación de Trk por estrés causado por sodio (Mendoza *et al.*, 1994; Casado *et al.*, 2010); y recientemente también se ha propuesto la proteína quinasa Snf1 que se activa en condiciones de estrés (Portillo *et al.*, 2005). Este aumento de la actividad transportadora de potasio de Trk, incrementa la entrada de potasio y reduce el potencial de membrana, lo que reduce a su vez la captación de cationes

tóxicos e incrementa la tolerancia a sal (Mulet *et al.*, 1999). Por otro lado, proteínas fosfatasa como Ppz1,2 (Yenush *et al.*, 2002) y la proteína quinasa Sky1 son los principales inhibidores de la actividad de Trk (Forment *et al.*, 2002).

El progreso de la biología molecular, sobre todo a partir del desarrollo de técnicas “ómicas” para la obtención de datos a gran escala, está permitiendo el avance en el conocimiento de los seres vivos en diferentes niveles y esto no es una excepción en el estudio de la homeostasis de iones en levaduras. Gracias a la genómica, proteómica, transcriptómica, metabolómica, etc., la denominada “biología de sistemas” está desarrollando una aproximación global al estudio de la homeostasis de iones. De hecho, en los últimos años se ha avanzado en el entendimiento de la regulación de los flujos de potasio gracias a la información aportada por la búsqueda e identificación de genes implicados (Barreto *et al.*, 2011), el estudio de modelos matemáticos para los mecanismos de homeostasis (Kahm *et al.*, 2012; Ke *et al.*, 2013) y las aproximaciones proteómicas en el estudio de la adaptación a diversas fases del crecimiento y al ayuno de potasio de *S. cerevisiae* (Curto *et al.*, 2010; Gelis *et al.*, 2012).

1.3. La homeostasis de potasio y sodio en levaduras no convencionales

Todas las especies necesitan regular las concentraciones de cationes alcalinos intracelulares, por ejemplo, manteniendo estable y alto el contenido de potasio y eliminando el exceso de sodio interno. Para este proceso todas las células de levadura, incluidas las no convencionales poseen sistemas eficientes y conservados en sus membranas plasmáticas para la absorción de potasio, dos sistemas diferentes de expulsión de cationes alcalinos (antiportadores y ATPasas), y además, la mayoría de ellas poseen canales de cationes (Figura 3). Hoy en día, además de los transportadores de la levadura modelo *S. cerevisiae*, se han caracterizado recientemente transportadores de otras especies de levaduras (no convencionales), osmotolerantes, capaces de crecer en presencia de altas

concentraciones de sal o azúcar, así como en especies patógenas como *Candida*, en las que se cree que el mantenimiento de la homeostasis de potasio y sodio contribuye a su patogenicidad (Ramos *et al.*, 2011).

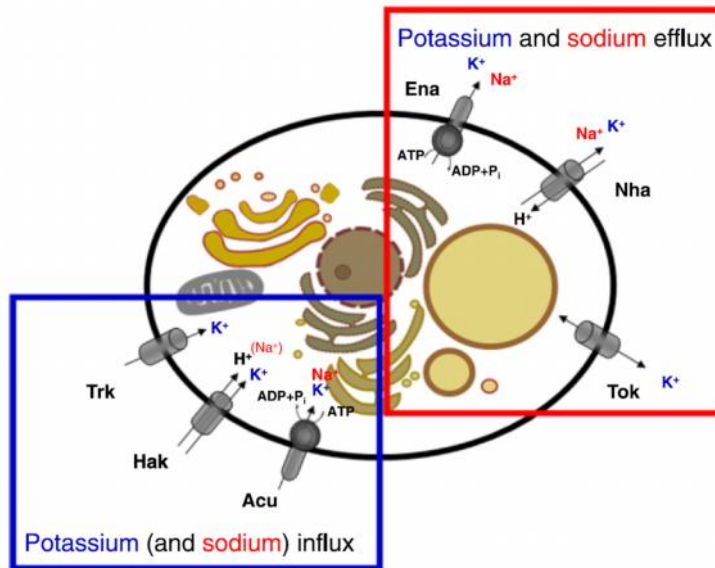


Figura 3. Sistemas de transporte de absorción y expulsión de potasio y/o sodio de la membrana plasmática de las especies de levadura no convencionales. Ramos *et al.*, 2011

Casi todas las levaduras cuyos genomas han sido secuenciados, a excepción de *Candida glabrata*, *Kluyveromyces lactis*, *Kluyveromyces thermotolerans*, *Saccharomyces kluyveri* y *Zygosaccharomyces rouxii*, están dotadas con más de un sistema de transporte de potasio. La existencia de dos sistemas de transporte en la mayoría de las especies de levadura refleja la importancia de tener un suministro eficiente de potasio. La identificación de sólo un gen que codifica un sistema de transporte de potasio en la cinco especies anteriores sugiere que quizás éstas dispongan de otro tipo de transporte de potasio actualmente desconocido, o que su sistema individual Trk es lo suficientemente eficaz para satisfacer todas las necesidades celulares (Rodríguez-Navarro 2000; Stříbný *et al.*, 2012).

Hasta ahora, en las levaduras no convencionales se han identificado tres sistemas de absorción de potasio eficientes, que difieren en sus mecanismos de transporte y en la estructura primaria proteica. La mayoría de estas levaduras presentan un transportador uniportador Trk y un simportador K^+/H^+ denominado Hak, y además, solamente algunas especies poseen un tercer transportador Acu, una ATPasa atípica que absorbe K^+ (Na^+) (Tabla 2). La existencia de diferentes sistemas de transporte de potasio en distintas combinaciones refleja la filogenia y la originalidad de los hábitats de las especies de levaduras (Ramos *et al.*, 2011; Střibný *et al.*, 2012).

Tabla 2. Visión general de los genes que codifican los sistemas de transporte activo de potasio en levaduras. Adaptado de Střibný *et al.*, 2012.

	Sistemas de absorción de K^+			
	<i>TRK1</i>	<i>TRK2</i>	<i>HAK1</i>	<i>ACU1</i>
<i>C. albicans</i>	+	-	+	+
<i>C. dubliniensis</i>	+	-	+	-
<i>C. glabrata</i>	+	-	-	-
<i>D. hansenii</i>	+	-	+	-
<i>D. occidentalis</i>	+	-	+	-
<i>K. lactis</i>	+	-	-	-
<i>K. thermotolerans</i>	+	-	-	-
<i>P. stipitis</i>	+	-	+	+
<i>S. cerevisiae</i>	+	+	-	-
<i>S. kluyveri</i>	+	-	-	-
<i>S. pombe</i>	+	+	-	-
<i>Y. lipolytica</i>	+	-	+	-
<i>Z. rouxii</i>	+	-	-	-

Anteriormente vimos que, en la levadura *S. cerevisiae*, el transporte de potasio depende principalmente de Trk1, mientras que la función de la proteína Trk2 en la absorción de potasio no es crucial y su actividad es prácticamente indetectable en presencia de *TRK1* (Ariño *et al.* 2010). En las levaduras no

convencionales han sido encontrados y caracterizados transportadores pertenecientes a la familia TRK. De entre todas estas levaduras, tan solo la levadura *Schizosaccharomyces pombe* es la única que posee dos genes *TRK* al igual que *S. cerevisiae*, pero a diferencia de ésta última ambos genes son igualmente importantes para el transporte de potasio (Madrid *et al.*, 1998). Las restantes levaduras no convencionales presentan un solo representante de Trk, Trk1, que suele actuar como transportador de baja afinidad ya que la mayoría de éstas presentan otro sistema de absorción que hace el papel de transportador de alta afinidad por el potasio (Ramos *et al.*, 2011). Éste otro sistema de transporte esta codificado, en muchas de estas levaduras, por los genes *HAK*, actuando como simportador de K^+/H^+ a través de la membrana plasmática, como en el caso de la levadura *Debaryomyces hansenii* o *Debaryomyces occidentalis* (anteriormente *Schwanniomyces occidentalis*) (Bañuelos *et al.*, 1995, 2000; Prista *et al.*, 2007). Cabe destacar que, se ha demostrado que en ciertas condiciones en la levadura *D. hansenii* el transportador Hak1 actúa como un simportador K^+/Na^+ . Además, la expresión de *DhHAK1* requiere una baja concentración externa tanto de potasio como de sodio, ya que en la ausencia de potasio, la presencia de sodio impide la expresión del gen (Martínez *et al.*, 2011). Por otro lado, la existencia de un tercer tipo de sistema de captación de K^+ mediante ATPasas Acu, ha sido recientemente descrita. Este sistema no está ampliamente distribuido en las levaduras no convencionales, pero está presente en algunas de ellas, como por ejemplo *Ustilago maydis* o *Pichia sorbitophila*. Las ATPasas Acu forman una nueva subfamilia de las ATPasas tipo P que intervienen en la captación de K^+ o Na^+ con alta afinidad (Benito *et al.*, 2004).

Asimismo, al igual que sucede con la levadura *S. cerevisiae*, las levaduras no convencionales necesitan mantener una concentración adecuada de sodio y potasio en el interior, y para ello disponen también de una serie de sistemas de transporte de expulsión que sirven para detoxificar la célula del exceso de sodio o potasio interno. De forma general, las levaduras no convencionales poseen ATPasas Ena y antiportadores Nha que están altamente conservados y que actúan de forma conjunta garantizando la expulsión del exceso de cationes alcalinos de la

célula. Además, al igual que sucede en la levadura convencional *S. cerevisiae*, la mayor parte de estos sistemas han desarrollado también la capacidad de exportar potasio de forma efectiva junto con los canales TOK, los cuales están altamente conservados entre las diferentes especies de levaduras y cuya actividad es importante para la regulación del potencial de membrana plasmática (Ramos *et al.*, 2011).

1.3.1. El transportador de potasio Hak1

Como se ha comentado anteriormente, muchas levaduras no convencionales contienen, además de Trk, un segundo tipo de transportador de potasio codificado por los genes *HAK* (High Affinity K⁺ transporter) (Rodríguez-Navarro 2000; Ramos *et al.*, 2011).

Hak1 fue identificado por primera vez en *D. occidentalis*, demostrando tener una homología significativa respecto al sistema Kup de *Escherichia coli*, una alta afinidad por el potasio ($K_m = 1 \mu\text{M}$), la no discriminación entre Rb^+ y K^+ , una pobre discriminación entre K^+ y Cs^+ , y una fuerte discriminación en contra de Na^+ y Li^+ (Bañuelos *et al.*, 1995). Genes ortólogos a *HAK1* han sido encontrados en muchos otros organismos, por ejemplo, en levaduras no convencionales como *D. hansenii* y *Candida albicans* (Prista, C. *et al.*, 2007; Miranda *et al.*, 2009; Martínez *et al.*, 2011), en hongos miceliares como *Neurospora crassa* (Haro *et al.*, 1999; Rivetta *et al.*, 2013), en el musgo *Physcomitrella patens* (Garcia-deblas *et al.*, 2007; Benito *et al.*, 2012) y en plantas superiores como *Arabidopsis thaliana* (Shabala y Cuin 2008). En este último caso, los genes *HAK* pueden tener distintas funciones dependiendo, por ejemplo, de su ubicación en la planta. La función precisa de estos genes en el transporte de potasio aún está siendo determinada, de momento, se ha propuesto por ejemplo que *HAK5* en *A. thaliana* (Gierth *et al.*, 2005) y en *Solanum lycopersicum* (Nieves-Cordones *et al.*, 2008) contribuye a la absorción de potasio con alta afinidad por las raíces de las plantas, funcionando de manera similar a las proteínas de las levaduras. Asimismo, cabe destacar que recientemente ha sido descrito por primera vez un transportador de potasio

codificado por un virus (de *Chlorella*), perteneciente a la familia HAK/KUP/KT (Greiner *et al.*, 2011).

En las levaduras, la función de Hak1 en el transporte de potasio ha sido estudiada en dos especies de *Debaryomyces*, *D. occidentalis* (Bañuelos *et al.*, 1995, 2000) y *D. hansenii* (Prista *et al.*, 2007; Martínez *et al.*, 2011), conteniendo ambas los genes *TRK1* y *HAK1*. Por un lado, se observó que cuando *HAK1* de *D. hansenii* se expresó heterológamente en un mutante de *S. cerevisiae* carente de sus propios transportadores de potasio (*trk1trk2*), éste mejoró el crecimiento en condiciones de bajo potasio, la acumulación de K^+ , y el transporte de Rb^+ (como análogo al K^+) (Prista *et al.*, 2007). Por otro lado, cuando *HAK1* de *D. occidentalis* fue expresado en un mutante doble *trk1trk2* de *S. cerevisiae*, se observó que podía agotar el potasio externo casi en la misma medida que la cepa silvestre de *D. occidentalis*. Investigaciones con *N. crassa* y *D. occidentalis* han demostrado que los transportadores Hak trabajan como simportadores K^+ - H^+ con una alta capacidad de captación y que se expresan bajo condiciones de ayuno de potasio. (Bañuelos *et al.*, 1995).

Los genes *HAK* son numerosos en plantas y están muy extendidos en hongos, es por esto que, la función de muchos de ellos aún está siendo estudiada y caracterizada. En el caso de *D. hansenii* se ha demostrado que, bajo ciertas condiciones el Na^+ puede sustituir los H^+ en el transportador Hak1 de forma que, el simporte K^+ - Na^+ es el que actuaría como mecanismo funcional de transporte (Figura 4). La expresión de *DhHAK1* requiere por tanto no solo un bajo potasio externo sino también una baja concentración de sodio, porque en ausencia de potasio, la presencia de sodio previene la expresión del gen. Además, la adición de concentraciones milimolares de K^+ o Na^+ a las células de *D. hansenii* provoca una rápida disminución en la expresión del gen *HAK1* (Martínez *et al.*, 2011). Asimismo, recientes investigaciones llevadas a cabo con el musgo *Physcomitrella patens* y la levadura *Yarrowia lipolytica*, donde los genes *HAK* codifican transportadores de Na^+ específicos, sugieren que algunos transportadores de

sodio/potasio Hak podrían jugar papeles fisiológicos en plantas y hongos más amplios de los que se conocen hasta ahora (Benito *et al.*, 2012).

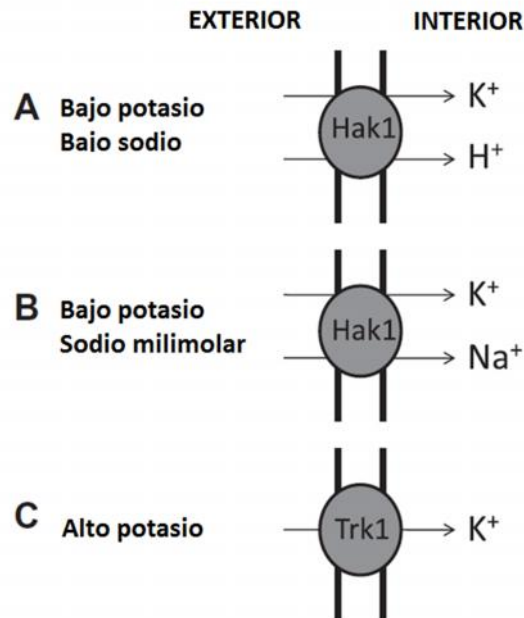


Figura 4. Modelo del posible mecanismo de transporte de potasio en *Debaryomyces hansenii*. En células ayunadas de potasio, *DhHak1* trabaja como simportador K^+ - H^+ (A); en presencia de una baja cantidad de sodio, Hak1 acopla los iones Na^+ haciendo funcionar el flujo de entrada de K^+ (B). En células normales de K^+ , el uniportador Trk1 es el que lleva a cabo el transporte de K^+ (C). Adaptado de Martínez *et al.*, 2011.

A diferencia de Trk, la estructura de los transportadores Hak no ha sido resuelta aún, pero diagramas de hidrofobicidad parecen indicar la existencia de 12 potenciales dominios transmembrana en la proteína (Kim *et al.*, 1998; Rubio *et al.*, 2000). Se sabe que los genes que codifican los transportadores tipo Hak son regulados y estimulados positivamente cuando el K^+ externo es escaso. Sin embargo, los mecanismos de regulación transcripcional y post-traduccionales de los transportadores tipo Hak aún están sin explorar.

2. LA LEVADURA *HANSENULA POLYMORPHA*

Hansenula polymorpha es una levadura metilotrófica y termotolerante, capaz de crecer a más de 50 °C (Ishchuk *et al.*, 2009). Se trata de una especie de levadura ubicua que se da naturalmente en el zumo de naranja en mal estado, en la harina de maíz, en el intestino de diversas especies de insectos y en el suelo. Crece en forma de colonias y no forma filamentos. Las cepas de *H. polymorpha* son homotáticas y la reproducción vegetativa tiene lugar por gemación (Ramezani-Rad *et al.*, 2003).

Durante las últimas décadas se han realizado diversos estudios sobre la levadura *H. polymorpha*. Tres caracteres de esta levadura en particular, suscitan el interés de los investigadores:

- Un rápido crecimiento a expensas del metanol como única fuente de carbono y energía (Levine y Cooney 1973).
- Una notable tolerancia al calor que permite el crecimiento a altas temperaturas (Teunisson *et al.*, 1960).
- Un fácil interconversión entre el estado haploide y diploide (Teunisson *et al.*, 1960).

2.1. Filogenia

En 1998, Kurtzman y Robnett presentaron el árbol filogenético de las levaduras ascomicetas, basándose en secuencias parciales de la subunidad grande del ADN ribosomal de las levaduras. En este estudio, *H. polymorpha* fue representada por la cepa de *Pichia angusta*, CBS7073, aislada a partir de *Drosophila pseudobscura*. Se demostró que esta cepa está estrechamente relacionada con la especie *H. polymorpha*, llegando a la conclusión de que al igual que *P. angusta*, *H. polymorpha* pertenece a la Familia *Saccharomycetaceae*, del Orden *Hemiascomycetes*, Filo *Ascomycota* (Kurtzman y Robnett, 1998).

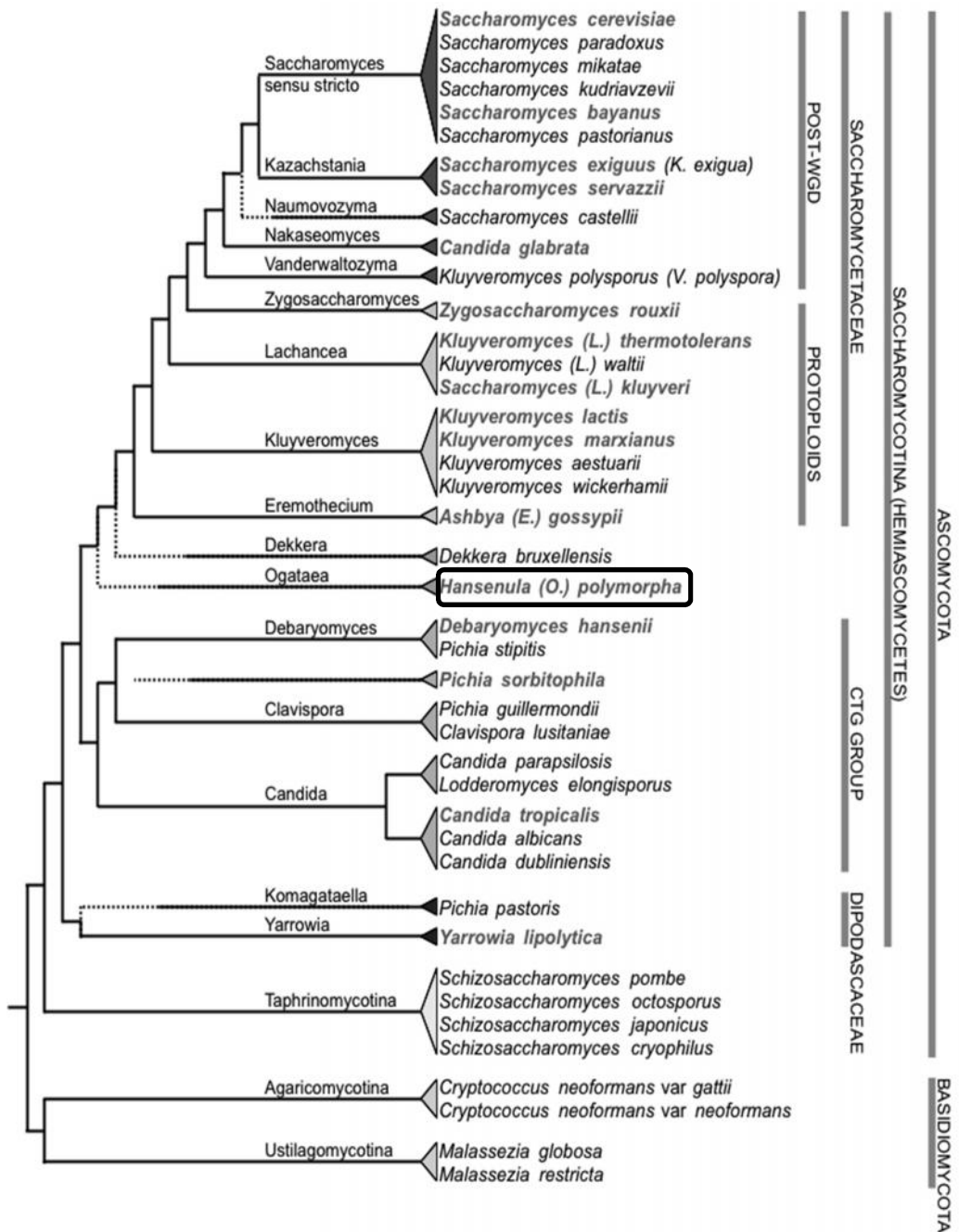


Figura 5. Cladograma que representa las relaciones filogenéticas de diferentes especies de levaduras. Basado en el análisis comparativo de sus genomas. Extraído de la página web del consorcio *Genolevures*.

En la figura anterior (Figura 5) se muestra el árbol filogenético que relaciona a *H. polymorpha* con distintas especies de levaduras, según el consorcio francés *Génolevures* (<http://www.genolevures.org/>).

2.2. Ecología

En 1951, Wickerham describió por primera vez la levadura *Hansenula angusta* en Florida (USA), aislándola del zumo de naranja concentrado en mal estado (50 % azúcares), el cual había sido conservado y pasteurizado pero aun así fermentó. Años más tarde, en 1959, se descubriría la cepa con la que han sido realizados la mayoría de estudios de *H. polymorpha*, la cepa CBS4732. Esta cepa fue aislada de los suelos regados con aguas residuales de una destilería en Pernambuco (Brasil) por Morais y Maia (Morais y Maia, 1959). Sin embargo, la primera descripción de *Hansenula angusta* no fue válida, y no fue hasta 1960 cuando se proporcionó una descripción correcta de la especie, recibiendo el nombre final de *Hansenula polymorpha*, y es por ello que éste sea el nombre más ampliamente aceptado (Teunisson *et al.*, 1960).

La especie se encuentra generalmente aislada tanto en estado haploide como diploide de forma natural en los hábitats. De hecho, *H. polymorpha* es una especie excelente para demostrar la conversión de una ploidía a la otra. Las colonias diploides y haploides pueden ser diferenciadas por el color, el tamaño y disposición de las células, y por los ascos conjugados o no conjugados que contienen las colonias haploides y diploides respectivamente (Teunisson *et al.*, 1960; Wickerham 1970).

Después de 1960 muchas cepas de especies de *Hansenula* han sido aisladas de diferentes orígenes: de la mosca de la fruta (*Drosophila pseudobscura* y otras especies), a partir del tracto intestinal del cerdo, del suelo en Suráfrica, del alpechín (residuo que se obtiene al presionar las aceitunas en la obtención del aceite), de restos de diversos árboles de hoja ancha y de larvas que se alimentan

de bellotas, etc. (Wickerham, 1970). Sin embargo, hasta ahora la mayoría de los trabajos y estudios de *H. polymorpha* han sido realizados principalmente en tres cepas de orígenes independientes, con diferentes características y relaciones poco claras: la cepa CBS4732, se aisló a partir del suelo en Brasil (Morais y Maia, 1959); la cepa NCYC495, que fue la primera en describirse, se aisló del zumo de naranja en mal estado y que fue denominada inicialmente como *Hansenula angusta* (Wickerham, 1951); y la cepa DL-1, aislada del suelo (Levine y Cooney, 1973). Las dos primeras cepas tienen capacidad de conjugación y esporulación, mientras que la cepa DL-1 no puede. Las cepas son empleadas principalmente en la producción de proteínas recombinantes, en el caso de CBS4732 y DL-1, mientras que la cepa NCYC495 se utiliza en el estudio de la asimilación de nitrato (Gellisen, 2002).

2.3. Características genéticas y aplicaciones

El estudio de este microorganismo es actualmente de gran interés, ya que es considerado como una de las levaduras “no convencionales” más importantes por su aplicación industrial. Es un organismo modelo favorable para la investigación de la función y la biogénesis de los peroxisomas (Gellisen, 2005; van der Klei *et al.*, 2006). Además, se ha utilizado para estudiar el control genético de los diversos aspectos del metabolismo celular intermedio como por ejemplo: el metabolismo de metanol (van der Klei *et al.*, 2006); la asimilación de nitratos como única fuente de nitrógeno (Siverio, 2002; Martín *et al.*, 2011); y la resistencia a metales pesados, estrés oxidativo y termoestabilidad (Reinders *et al.*, 1999; Mannazzu *et al.*, 2000). Asimismo, *H. polymorpha* se ha convertido en un organismo modelo para la producción de proteínas recombinantes a escala industrial. Sus productos van desde el fin terapéutico, tales como vacunas de hepatitis B e insulina para el tratamiento de la diabetes, a las enzimas industriales como la fitasa (aditivo para la alimentación) (Gellisen, 2002; Stöckmann *et al.*, 2009).

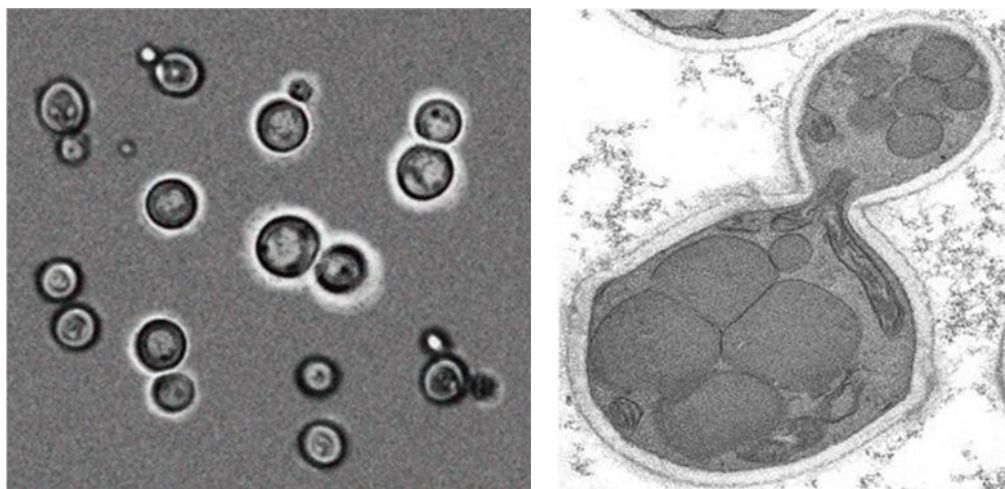


Figura 6. Imágenes de *Hansenula polymorpha* al microscopio óptico (izquierda) y al microscopio electrónico de transmisión (derecha).

Tanto para la investigación básica como para las aplicaciones biotecnológicas, la ingeniería genética es crucial. Durante los últimos 20 años diversas herramientas genéticas se han desarrollado para *H. polymorpha* (Saraya *et al.*, 2012). Esto incluye, entre otros: procedimientos eficaces de transformación por electroporación, por el método de litio-acetato y, más recientemente con el uso de un nuevo polímero oligoelectrolítico a nanoescala (Filyak *et al.*, 2013); la construcción de más vectores de expresión; así como casetes de integración dirigida para la delección de genes (Faber *et al.*, 1992, 1994; Gellissen *et al.*, 2005; Kang y Gellissen, 2005; Böer *et al.*, 2007).

Por otro lado, el genoma de la cepa CBS4732 y, más recientemente, el de la cepa NCYC495 ha sido secuenciado por completo (Ramezani-Rad *et al.*, 2003; <http://genome.jgipsf.org/Hanpo2>). Esta información ha facilitado considerablemente la investigación molecular y ha permitido a la biología de sistemas nuevos enfoques, como el análisis transcriptómico (van Zutphen *et al.*, 2010). La secuencia del genoma de la cepa DL-1 también se conoce, pero ésta es sólo aproximadamente el 95% idéntica a la cepa CBS4732 y NCYC495, lo que supone que podría representar una especie diferente (Eldarov *et al.*, 2011; Saraya *et al.*, 2012;).

2.4. Homeostasis de iones de potasio y sodio en *H. polymorpha*

Con respecto al transporte de potasio y sodio, en *H. polymorpha* podemos afirmar que se carece por completo de información publicada anteriormente al inicio del desarrollo de este trabajo de Tesis. Dentro de la poca información de la que disponemos, gracias al trabajo realizado en el laboratorio del profesor J.M. Siverio (Universidad de La Laguna), sabemos que Ure2 participa no sólo en la represión catabólica del nitrógeno (como sucede en *S. cerevisiae*), sino que también está involucrado positivamente en la tolerancia a sal de *H. polymorpha* a través de la homeostasis de Ca^{2+} y de la calcineurina, regulando la expresión de *ENA1* (Rodríguez *et al.*, 2010).

Investigaciones realizadas previamente en el grupo del Dr. J.M. Siverio indicaban la existencia en *Hansenula polymorpha* de genes *TRK* y *HAK* ortólogos a los descritos en *D. occidentalis* (Dr. Y. Martín, Tesis Doctoral, 2008). Con este trabajo se ha tratado de realizar un primer estudio sobre la homeostasis de potasio y sodio en *H. polymorpha* aprovechando la disponibilidad de mutantes carentes de los sistemas de transporte de potasio, Hak1 y Trk1. Hemos determinado los requerimientos de K^+ de la cepa silvestre y de los correspondientes mutantes y hemos caracterizado los procesos relacionados con los flujos de entrada de potasio y sodio, y su regulación desde diversas aproximaciones experimentales. Se propone que, el transportador Hak1 es el transportador de alta afinidad de potasio que, en determinadas condiciones, funciona como transportador de sodio (litio), y que Trk1 posee un papel fundamental en la tolerancia a sal actuando de forma indirecta a través de Hak1, lo que coincide con la idea previa de que los transportadores de potasio pueden tener funciones adicionales al transporte de dicho catión. Además, se aportan algunos datos fisiológicos complementarios que pueden ayudar a ampliar el conocimiento de ésta levadura.

OBJETIVOS

El objetivo general de este trabajo es contribuir a la comprensión de los procesos de homeostasis de cationes, más concretamente potasio y sodio, en la levadura no convencional *Hansenula polymorpha*. Para ello se han propuesto una serie de objetivos específicos:

- Caracterización de los requerimientos de potasio de *H. polymorpha*.
- Estudio de la aportación de Hak1 y Trk1 al transporte de potasio y análisis de la posible existencia de un tercer transportador específico de potasio en esta levadura.
- Definición de la aportación de Hak1 y Trk1 en la tolerancia a sodio.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. MATERIAL BIOLÓGICO. MICROORGANISMOS

En este trabajo se ha utilizado como organismo base la levadura *Hansenula polymorpha* de genotipo silvestre (NCYC495), facilitada por el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de La Laguna. Además, se han empleado otras cepas de *H. polymorpha* con mutaciones en distintos transportadores de potasio y en el gen de la calcineurina, que se recogen en la Tabla 3.

Tabla 3. Relación de cepas de *Hansenula polymorpha* empleadas en este trabajo.

Nombre	Genotipo relevante	Fuente
Cepa silvestre (WT)	NCYC495 <i>leu2::p18B1(LEU2) ura3::pBSURA3(URA3)</i>	J.M Siverio (ULL)
<i>Δtrk1</i>	<i>Δtrk1::URA3</i>	J.M. Siverio (ULL)
<i>Δhak1</i>	<i>Δhak1::LEU2</i>	J.M. Siverio (ULL)
<i>Δhak1Δtrk1</i>	<i>Δhak1::LEU2 Δtrk1::URA3</i>	J.M. Siverio (ULL)
WT (PlacZ)	NCYC495 <i>leu2::pP_{HAK1}-lacZ</i>	J.M. Siverio (ULL)
<i>Δcnb1</i> (PlacZ)	<i>Δcnb1::URA3 leu2::pP_{HAK1}-lacZ</i>	J.M. Siverio (ULL)
<i>Δtrk1</i> (PlacZ)	<i>Δtrk1::URA3 leu2::pP_{HAK1}-lacZ</i>	J.M. Siverio (ULL)
<i>Δtrk1Δcnb1</i> (PlacZ)	<i>Δtrk1::URA3 Δcnb1::ble leu2::pP_{HAK1}-lacZ</i>	J.M. Siverio (ULL)

2. MEDIOS DE CULTIVO. CRECIMIENTO Y MANTENIMIENTO DE MICROORGANISMOS

La composición de los medios empleados para el crecimiento y mantenimiento de las cepas de levadura utilizadas en este trabajo se describen en la Tabla 4. La esterilización de los medios se llevó a cabo en autoclave durante 20 minutos a 120 °C de temperatura y 1 atmósfera de presión.

El mantenimiento de las cepas se realizó tanto en medio rico clásico Yeast Peptone Dextrose (YPD) como en medio mínimo Yeast Nitrogen Base (YNB) suplementado con aminoácidos. Cuando se requirieron medios de cultivo sin trazas de potasio, se preparó un medio sintético completo (SC) utilizando YNB de Formedium (YNB-F). Tanto el medio YNB como el medio YNB-F se ajustaron a pH 5,8.

Para su mantenimiento, los cultivos fueron inoculados cada 15 días y mantenidos a 4 °C. Cuando se requirió de un almacenamiento por un periodo de tiempo prolongado se realizaron suspensiones celulares de glicerol al 20% conservadas a -80 °C.

Tabla 4. Composición de los medios utilizados.

Medio	Composición	Referencia
YPD	D-glucosa 2%, peptona 2%, extracto de levadura 1%	Sherman, 1991
YNB	D-glucosa 2%, YNB 0,17%, (NH ₄) ₂ SO ₄ 0,4%, auxotrofias según requerimientos [†]	Sherman <i>et al.</i> , 1986
Translucent YNB-Formedium (YNB-F)	YNB-Formedium 1,63 g/l, D-glucosa 2%, (NH ₄) ₂ SO ₄ 4 g/l, Brent supplement mix 1,285 g/l	Navarrete <i>et al.</i> , 2010

[†]histidina 40 mg/l, leucina 60 mg/l, triptófano 40 mg/l, uracilo 40 mg/l, adenina 20 mg/l, metionina 20 mg/l

2.1. Crecimiento en medio líquido

El volumen empleado para el crecimiento en medio líquido fue de 50 ml de medio en matraces de 250 ml, los cuales se mantuvieron en agitación (180-200 rpm) en estufas a 37 °C. La absorbancia se midió a 600 nm en un espectrofotómetro Beckman DU 640.

En los estudios cinéticos, así como en los ensayos de expresión génica, el medio utilizado fue YNB-F suplementado con la cantidad adecuada de KCl (0-50 mM) o NaCl (0-0,5 M) según la condición estudiada.

2.2. Crecimiento en medio sólido

La preparación de medio sólido se realizó mediante la adición de agar al medio líquido a una concentración del 2%. Las placas se incubaron a 37 °C durante 48-72 horas en función del ensayo realizado.

3. ANÁLISIS DEL CRECIMIENTO DE LAS CEPAS

3.1. Tasa de crecimiento en medio líquido

Para estudiar el tiempo de duplicación se inocularon las células, a partir de un cultivo previo (crecido durante 24 horas a 37 °C y 200 rpm en YPD), con una A_{600nm} de 0,03 en 5 ml de medio líquido YNB-F en tubos de 10 ml a los que se les añadieron las concentraciones requeridas de KCl (0,2-50 mM) o NaCl (0,5-1,1 M). Se incubaron a 37 °C y a una agitación adecuada para su correcta aireación.

Se siguió el crecimiento de las células midiendo su absorbancia a 600 nm en un Spectronic 20D (Milton Roy) durante 24-48 horas.

3.2. Análisis fenotípico por test goteo

Partiendo de un cultivo previo, se preparó una suspensión celular con una A_{600nm} igual a 1, a partir de la cual se realizaron diluciones seriadas en agua desionizada estéril (1:10, 1:100, 1:1000).

La inoculación en placa se hizo mediante gotas de 4 μ l de volumen, de cada una de las diluciones en orden de mayor a menor concentración celular. Las placas se incubaron durante 48-72 horas a 37 °C en función del ensayo realizado.

Se realizaron test de goteo en placas de YNB, YNB-F o YPD con diferentes concentraciones de KCl (0,1-50 mM), NaCl (0,1-1,1 M), LiCl (1-30 mM) y de distintas drogas como la higromicina B (50-250 μ g/ml), el TMA (0,1-0,7 M) y la

espermina (1-3 mM). En todos los casos se realizó siempre una placa control que no contenía ninguna sustancia que provocase un anormal crecimiento de las células. En el apartado de Resultados solo se muestran las placas más representativas de las condiciones estudiadas.

3.3. Análisis fenotípico por tamaño de colonias

Partiendo de un cultivo previo, se preparó una suspensión celular con una absorbancia a 600 nm de 1, a partir de la cual se obtuvo una dilución 1:10000 en agua desionizada estéril.

La inoculación en placa se hizo por siembra en superficie de 100 μ l de la dilución celular mediante la ayuda de un asa de digralsky en placas de YNB-F con KCl añadido (0,1-50 mM). Las placas se incubaron durante 48-72 horas a 37 °C.

La medida del tamaño de las colonias se realizó mediante el programa Image J a partir de una medida de referencia. Se contabilizaron el 90% de las colonias crecidas por placa calculando el tamaño medio de las colonias así como el tamaño de la colonia mínima y máxima encontrada en cada condición estudiada. El número de colonias analizadas por placa fue aproximadamente de 60-70.

4. MÉTODOS DE BIOLOGÍA MOLECULAR

4.1. Técnicas de extracción de ARN

La extracción de ARN se realizó a partir de un cultivo de células crecido o sometido a diferentes condiciones de KCl y/o NaCl. En todos los casos, las células se recuperaron mediante centrifugación durante 1,5 minutos a 7500 rpm y se utilizó el kit comercial Master Pure™ Yeast RNA Purification Kit (Epicentre, Biotechnologies) para la obtención del ARN. Para evitar posibles contaminaciones

por ADN genómico de la levadura, se incluyó un paso más de purificación con ADNasa.

Las muestras de ARN se conservaron a -20 °C para periodos cortos de tiempo (1-3 días) o a -80 °C durante periodos más largos. No obstante, debido a la fragilidad del ARN éste se utilizó habitualmente recién extraído.

4.2. Determinación de la concentración de ácidos nucleicos

El ARN obtenido se cuantificó utilizando un equipo NanoDrop 2000 Spectrophotometer (ThermoScientific). Así mismo se comprobó su pureza, indicada por el cociente entre la absorbancia a 260 nm y 280 nm, que siempre se mantuvo entre los valores óptimos de 2 a 2,2.

4.3. Determinación de la expresión génica mediante PCR a tiempo real

La técnica de PCR a tiempo real (qRT-PCR) se utilizó para realizar cuantificaciones relativas de la expresión génica de distintos genes de interés en diversas condiciones de potasio y sodio. La PCR es la segunda parte de una técnica en la que primero se sintetiza el ADN copia (ADNc) a partir de ARN extraído. Este ADNc es el molde de la reacción de PCR a tiempo real.

La síntesis de ADNc se realizó por retrotranscripción del ARN total (20 ng por reacción), usando un kit comercial iScript™cDNASynthesis Kit (Bio-Rad) siguiendo las instrucciones facilitadas por el fabricante. La reacción se llevó a cabo en un Eppendorf Mastercycler Personal, según el siguiente programa y para un volumen final de 20 µl:

- 25 °C durante 5 minutos
- 42 °C durante 30 minutos
- 85 °C durante 5 minutos

Para los ensayos de PCR a tiempo real se utilizó la mezcla iQ™ SYBR® Green Supermix (BioRad) a la que, para cada reacción, se añadieron 2 µl del ADNc obtenido en el paso anterior (según recomendación del fabricante). Las reacciones se llevaron a cabo en un termociclador MiniOpticon™ (BioRad), con el programa indicado en la siguiente tabla (Tabla 5).

Tabla 5. Programa de la PCR a tiempo real.

Fase	Tiempo	Temperatura	Repeticiones
Desnaturalización	5 min	95 °C	1 ciclo
Amplificación y cuantificación	30 seg	95 °C	45 ciclos
	30 seg	62 °C	
	30 seg	72 °C	
Fusión	$\Delta 0,5 \text{ }^{\circ}\text{C} \cdot 10 \text{ seg}^{-1}$	70-95 °C	

La obtención de las curvas de melting transcurrida la reacción de PCR a tiempo real se llevó a cabo en un rango de temperaturas comprendido entre 70 y 95 °C, programando una lectura de fluorescencia a intervalos de 0,5 °C.

Se llevaron a cabo reacciones en las que se comparó la expresión de varios genes en una misma cepa y distintas condiciones y además, por otro lado, también se comparó la expresión de un mismo gen en diferentes cepas y condiciones. Siempre se incluyó un gen de referencia para cada cepa o condición, de manera que se pudieran relativizar los resultados obtenidos para nuestros genes con los obtenidos por el gen de referencia, en este caso el gen de la actina (*ACT1*). Comprobamos que la expresión de este gen no variaba significativamente al variar de condición experimental. Cuando se analizó la expresión de un mismo gen en diferentes cepas los valores obtenidos se compararon con los de la cepa silvestre en condición control (50 mM KCl).

El análisis de la cuantificación relativa de la expresión génica se llevó a cabo de forma manual a partir de los valores de C_T (Cycle Treshold) sin utilizar

programas informáticos. El valor de C_T indica el ciclo de la PCR en que la fluorescencia emitida por una determinada muestra cruza un determinado ciclo umbral, de manera que la cuantificación de la expresión de un determinado gen va en función de la “rapidez” con la que se alcanza dicho ciclo umbral (Pfaffl, 2001).

Para el análisis de la expresión relativa de los genes estudiados, los C_T obtenidos en cada reacción se normalizaron respecto a los niveles de transcrito del gen de control interno (*HpACT1*) y expresados en relación a la condición control (crecimiento en presencia de KCl 50 mM).

4.4. Cebadores

Los cebadores utilizados para la PCR a tiempo real de cada uno de los genes estudiados así como del gen de control interno, fueron diseñados por el Dr. Yusé Martín (Tesis Doctoral, 2008) y obtenidos a través de Isogenlife (www.isogen-lifescience.com). En la Tabla 6 se muestran los cebadores empleados y algunos parámetros característicos, junto con la secuencia de los mismos.

Tabla 6. Oligonucleótidos empleados como cebadores en las reacciones de PCR a tiempo real.

Nombre	Secuencia (5'→ 3')	Tm (°C) †	% G+C
HpHAK1-Fw	GTGGGAGCCATCTATGGAGA	59,4	55
HpHAK1-Re	CTGCCACCTTCGTTGTTAT	57,3	50
HpTRK1-Fw	CACCAGAATTGGGAGACGTT	57,3	50
HpTRK1-Re	ATGGTTGGTGCCAGGAGAG	59,4	55
HpACT1-Fw	GAGGTTACACGTTCTCCACCA	59,8	52,4
HpACT1-Re	ACCTGTCAATCAGGCAACTC	57,3	50

†Temperatura de “melting” de los cebadores.

5. MÉTODOS BIOQUÍMICOS

5.1. Obtención de células con diferentes niveles de potasio

A lo largo de este trabajo se utilizaron células crecidas en diferentes condiciones de potasio y sometidas a distintos tratamientos de ayuno de potasio. De forma general denominamos células normales a aquellas crecidas bajo condiciones no limitantes de potasio con 50 mM KCl (condición control), y células ayunadas a las que, tras ser crecidas en este medio, se centrifugaron (4500 rpm, 3-4 minutos), lavaron con agua fría ultrapura y posteriormente fueron incubadas durante varias horas en YNB-F sin potasio añadido.

5.2. Análisis del contenido interno y de los flujos de cationes alcalinos

La acumulación o la pérdida de cationes a lo largo del tiempo se determinaron mediante el análisis del contenido de cationes en la célula o de los cambios en el medio externo. Los tiempos de toma de muestras se ajustaron en función al tipo de ensayo.

5.2.1. Contenido interno de cationes

H. polymorpha se inoculó en medio YNB-F suplementado con las concentraciones oportunas de potasio (0,5 o 50 mM KCl) o en YPD con sodio (0,5 M NaCl) o litio (5 mM LiCl). Cuando se alcanzó una A_{600nm} de 0,3-0,4, se tomaron muestras de 1-5 ml que se filtraron (filtros Millipore AAWP, 0,8 μ m de diámetro) y lavaron con una solución 20 mM de $MgCl_2$. Un segundo lavado se llevó a cabo por arrastre y resuspensión de las células sobre otro filtro. El contenido celular se obtuvo mediante lisis ácida con 5 ml de una solución de HCl 0,2 M y $MgCl_2$ 10 mM durante 12-24 horas. Posteriormente se procedió a centrifugar para separar los restos celulares (4500 rpm, 2 minutos). Las concentraciones de

cationes presentes en el sobrenadante se midieron en un espectrofotómetro de absorción atómica (SpectrAA-240FS, Varian) y el contenido se expresó en nanomoles de catión por miligramo de peso seco de células (Ramos *et al.*, 1990).

Del mismo modo se estudió también el contenido interno de cationes en células ayunadas de potasio en medio YNB-F sin KCl añadido. Se tomaron muestras a lo largo de su ayuno durante 2 horas y se procedió de la misma forma anteriormente descrita.

5.2.2. Entrada de cationes

Los flujos de entrada de litio (como catión análogo al sodio) se midieron a partir de células crecidas en medio YPD (50 ml) en presencia o ausencia de sodio (0,5 M NaCl). Las células se recogieron por centrifugación (4500 rpm, 3-4 minutos), se lavaron con agua ultrapura fría y se resuspendieron en 50 ml de YPD, ajustando la $A_{600\text{nm}}$ a 0,3-0,4. A tiempo cero se añadió LiCl (100 mM) y se tomaron muestras de células periódicamente mediante filtración. El procedimiento seguido en el tratamiento de las células fue el explicado en el apartado anterior.

Los flujos de entrada de rubidio (como catión análogo al potasio) se estudiaron en células normales o crecidas en 0,5 mM de KCl en medio YNB-F. Posteriormente las células se centrifugaron (4500 rpm, 3-4 minutos) y se resuspendieron en el mismo medio, ajustando la $A_{600\text{nm}}$ a 0,3-0,4. A tiempo cero se añadió RbCl (10 mM) y se tomaron muestras periódicamente mediante filtración. De nuevo el procedimiento seguido en el tratamiento de las células fue el explicado en el apartado 5.2.1.

Las concentraciones de Li^+ o Rb^+ se midieron mediante espectrofotometría de absorción atómica y el contenido de estos cationes se expresó en nanomoles por miligramo de peso seco de células.

Los parámetros de la cinética de transporte de rubidio (velocidad máxima y constante de afinidad o K_m) se dedujeron a partir de los resultados obtenidos en

los ensayos de entrada de RbCl a distintas concentraciones, mediante una representación doble recíproca. Se estudiaron los parámetros de células normales, células ayunadas de potasio (2 horas), y células crecidas en presencia de 0,5 mM KCl en medio YNB-F. Con el objetivo de estandarizar los cálculos, los ensayos de entrada de RbCl se realizaron, para este fin, en tampón de ensayo MES (ácido 2-[N-Morfolino] etanosulfónico, 10 mM) suplementado con MgCl₂ 0,1 mM, glucosa 2% y ajustado a pH 5,8 con Ca(OH)₂.

5.2.3. Cambios en los cationes extracelulares

Los cambios de K⁺ en el medio se midieron en células normales y células ayunadas de potasio (4 horas) en medio YNB-F (100 ml). Las células se recogieron por centrifugación (4500 rpm, 3-4 minutos), se lavaron con agua ultrapura fría y se resuspendieron en tampón de ensayo MES (descrito en el apartado anterior) suplementado con KCl (40 μM para células normales y 80 μM para células ayunadas), ajustando la A_{600nm} a 0,6-0,7. Se tomaron muestras directas del medio a lo largo del tiempo durante 3 horas. Las muestras se filtraron y se analizó directamente la concentración de K⁺ del líquido mediante espectrofotometría de absorción atómica.

Los cambios de Li⁺ y Na⁺ en el medio se midieron igual que el K⁺. En esta ocasión, sólo se midieron en células ayunadas de potasio (2 horas) en medio YNB-F sin potasio añadido y el tampón de ensayo MES fue suplementado con 100 μM del catión correspondiente (LiCl o NaCl).

Las concentraciones de los cationes en el medio se calcularon mediante espectrofotometría de absorción atómica y el contenido de estos cationes se expresó en μmolar (μM).

5.3. Determinación del volumen celular

Las mediciones del volumen celular se llevaron a cabo en cultivos líquidos de las cepas de *H. polymorpha* crecidas en medio YNB-F suplementado con diferentes condiciones de potasio y sodio (50 mM KCl o 50 mM KCl y 0,5 M de NaCl) así como en células ayunadas de potasio (2 horas). Las células se recogieron mediante centrifugación (4500 rpm, 3-4 minutos) y se lavaron con agua ultrapura para posteriormente resuspenderlas en tampón Isotón II (Beckman-Coulter) y medir automáticamente la distribución del volumen celular a lo largo de la población (Navarrete *et al.*, 2010). El ensayo se repitió más de tres veces para cada condición experimental, y los resultados obtenidos se expresaron en femtolitros (fL).

El volumen celular se determinó gracias a un contador de células Z2 (Beckman-Coulter). El método utilizado, para la medición del volumen celular así como para el conteo de células, se basa en cambios medibles de resistencia eléctrica producidos por las partículas no conductoras (en nuestro caso células de levaduras) que se encuentran en suspensión en un electrolito. Las partículas pasan a través de un sensor entre dos electrodos y desplazan un cierto volumen de electrolito, igual al suyo propio. Este volumen desplazado es proporcional al volumen de la partícula y puede ser medido en forma de un impulso eléctrico.

Para el análisis de los resultados se utilizó el programa COULTER AccuComp 3.01 de Beckman-Coulter.

5.4. Análisis del potencial relativo de membrana

Para medir los valores del potencial relativo de membrana de las cepas de *H. polymorpha* crecidas en diferentes condiciones de potasio y sodio se utilizó la sonda fluorescente diS-C₃(3) (3,3'-dipropylthiacarbocyanide iodide) (Gaskova *et al.*, 1998) a partir de una solución madre 2,5 mM preparada en etanol, según el método descrito por Marešová *et al.* (2009). Las células de levadura estudiadas

crecieron en YNB-F con potasio (50 mM) con o sin sodio añadido (0,5 M). Las células ayunadas de potasio (2, 4 o 6 horas) también fueron analizadas.

Las células se recogieron mediante centrifugación (4500 rpm, 3-4 minutos), se lavaron hasta dos veces con un tampón MES-TEA (10 mM MES ajustado a un pH 6,0 con triethanolamina), y se resuspendieron en el mismo tampón hasta una $A_{600\text{nm}}$ de 0,1 en un volumen final de 3 ml. A esta suspensión de células se añadió el fluoróforo [diS-C₃(3)] a una concentración final de 0,2 μM e inmediatamente la muestra fue analizada en un espectrofluorímetro ISS PC1. Para la medida se ajustaron las longitudes de onda del aparato de excitación (531 nm) y emisión (560 y 580 nm).

La medida se prolongó durante 40 minutos y con los datos obtenidos se estimó la intensidad 560/580 nm del ratio en el equilibrio (Malac *et al.*, 2005).

5.5. Efecto de la glucosa sobre el pH extracelular.

El análisis del efecto de la glucosa en la acidificación del medio se realizó mediante un estudio de seguimiento de los cambios del pH en el medio de las células cuando éstas fueron sometidas a ausencia y presencia de glucosa. Los cambios en el pH del medio se midieron a partir de los cambios de absorbancia de las muestras a lo largo del tiempo, estimados gracias al indicador de pH colorimétrico BCG (Bromocresol Green Sodium Salt). Las medidas de absorbancia se realizaron de forma automática mediante la utilización de un lector de absorbancia de microplacas (BioTek Instruments) para placas ELISA de 96 pocillos, equipado con un agitador y una unidad de control de la temperatura (37 °C), todo ello conectado a un ordenador Dell con el software para análisis de datos Gen5 (BioTek Instruments).

Las células a estudiar crecieron en condiciones no limitantes de potasio (YNB-F suplementado con 50 mM de KCl). Al día siguiente fueron centrifugadas (4500 rpm, 3-4 minutos), lavadas con agua ultrapura y resuspendidas posteriormente en el mismo medio sin glucosa y con el indicador de pH BCG

(concentración final 0,01%) a una A_{600nm} de 0,02. La placa de ELISA se rellenó con estas suspensiones celulares (sin glucosa) y con patrones de pH obtenidos “manualmente” tal y como se indica en la Figura 7. Estos patrones “manuales” son los que utiliza el lector para poder calcular el pH del medio y se obtienen a partir del mismo medio en el que crecieron las células, ajustando para ello el medio empleado a diferentes pH (de 3 a 6,5) y añadiendo posteriormente el indicador BCG (concentración final 0,01%).

El ensayo consistió en monitorizar la absorbancia del medio de las células a estudiar durante una hora, momento en el que fue añadida la cantidad necesaria de glucosa en cada pocillo de la muestra para tener una concentración final de 2% e iniciar la acidificación del medio. Se tomaron muestras sobre los cambios en la absorbancia durante 3 horas adicionales (Marešová *et al.*, 2007).

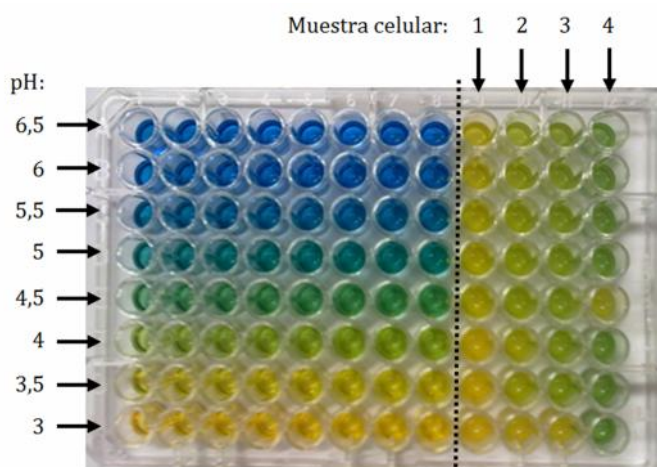


Figura 7. Placa para la monitorización de la acidificación del medio. En la figura se muestra como están distribuidas las muestras celulares y los patrones de pH en la placa. Se trata de la imagen de una placa tras el desarrollo del experimento de ahí el color amarillento (pH 3-3,5) de las muestras.

5.6. Diseño experimental y estadístico

Todos los experimentos bioquímicos se realizaron al menos tres veces y en todos los considerados válidos, el error estándar fue menor al 15%.

6. PROCEDIMIENTOS INFORMÁTICOS Y BASES DE DATOS

Para las búsquedas bibliográficas se usaron periódicamente las bases de datos PubMed™ y MEDLINE™.

Para la comparación (BLAST) e información de secuencias se recurrió a la base de datos de ADN del “*National Center of Biotechnology Information*” (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) y la página web del consorcio *Genolevures* (<http://www.genolevures.org>).

Las secuencias de *H. polymorpha* fueron proporcionadas por el grupo del Dr. J.M. Siverio del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de La Laguna.

El alineamiento de secuencias de aminoácidos y la construcción del árbol filogenético se realizaron mediante el programa CLC Sequence Viewer Version 6.8.2., empleando el algoritmo ClustalW. Las figuras de los árboles filogenéticos se realizaron mediante el programa Dendroscope 3.2.8.

El diseño de cebadores se llevó a cabo con los distintos programas de software Oligo v.6. y Vector NTI 10.

El análisis del crecimiento en superficie se realizó con el programa ImageJ (<http://rsbweb.nih.gov/ij>).

Para el análisis del volumen celular se utilizó el programa COULTER AccuComp 3.01 de Beckman-Coulter.

Los datos de la acidificación del medio fueron calculados y tratados con el programa Gen5 (BioTek Instruments).

Parte de los análisis estadísticos se realizaron con el programa estadístico IBM SPSS Statistics 20.

RESULTADOS

CAPÍTULO 1

Análisis bioinformático de las proteínas HpHak1 y HpTrk1

CAPÍTULO 2

Caracterización de la función de los transportadores de potasio Hak1 y Trk1 en Hansenula polymorpha

CAPÍTULO 3

Análisis de la función de los transportadores de potasio Hak1 y Trk1 en la homeostasis de sodio/litio en Hansenula polymorpha

CAPÍTULO 4

Otros aspectos en la caracterización de Hansenula polymorpha

CAPÍTULO 1

**ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO DE LAS
PROTEÍNAS *HPHAK1* Y *HPTRK1***

1. Antecedentes

En el año 2008, como parte de la tesis desarrollada por el Dr. Y. Martín bajo la dirección del Dr. J.M. Siverio, en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de la Laguna, se inició la identificación de los posibles sistemas de transporte de alta afinidad para potasio en *Hansenula polymorpha* con el objetivo de estudiar en profundidad el papel de la quinasa Npr1 sobre el transporte de K⁺.

El hecho de que *H. polymorpha* sea una levadura no convencional, aislada del suelo al igual que *D. occidentalis*, llevó a considerar la posibilidad de que en el transporte de potasio de alta afinidad de *H. polymorpha* también estuvieran implicados dos sistemas de transporte (Hak y Trk), por ello el grupo del Dr. J.M. Siverio realizó una búsqueda en el genoma de hipotéticas proteínas similares a Trk1 y Hak1 de *D. occidentalis*. Los resultados obtenidos mostraron dos pautas abiertas de lectura que codificaban proteínas con alta similitud a las indicadas confirmando así, la existencia en esta levadura de genes *TRK* y *HAK* ortólogos a los descritos en *D. occidentalis* y *D. hansenii*, que denominaron *HAK1* y *TRK1*. A través de este trabajo intentaremos confirmar si estos dos genes codifican realmente transportadores de potasio y estudiaremos su papel en la homeostasis de potasio y sodio en *H. polymorpha*. A lo largo de éste capítulo se muestra un breve estudio bioinformático de las secuencias de las proteínas.

2. Análisis de secuencias

Las secuencias de las proteínas *HpHak1* y *HpTrk1* se compararon por separado mediante BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) con las secuencias de otras proteínas Hak y Trk de varias levaduras, así como de hongos filamentosos y plantas, organismos que junto con *H. polymorpha* portan este tipo de transportadores, con el fin de buscar el grado de identidad y similitud entre ellos, usando la base de datos de NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) (Tabla 7 y 8).

Tabla 7. Identidad y similitud entre *HpHak1* y proteínas relacionadas

	% Identidad (% Similitud)				
	<i>DhHak1</i>	<i>DoHak1</i>	<i>CaHak1</i>	<i>AtHak5</i>	<i>NcHak1</i>
<i>HpHak1</i>	46 (63)	46 (65)	44 (62)	31 (49)	31 (48)
<i>DhHak1</i>		65 (78)	54 (68)	32 (51)	28 (47)
<i>DoHak1</i>			59 (74)	33 (51)	31 (48)
<i>CaHak1</i>				32 (52)	33 (50)
<i>AtHak5</i>					33 (56)

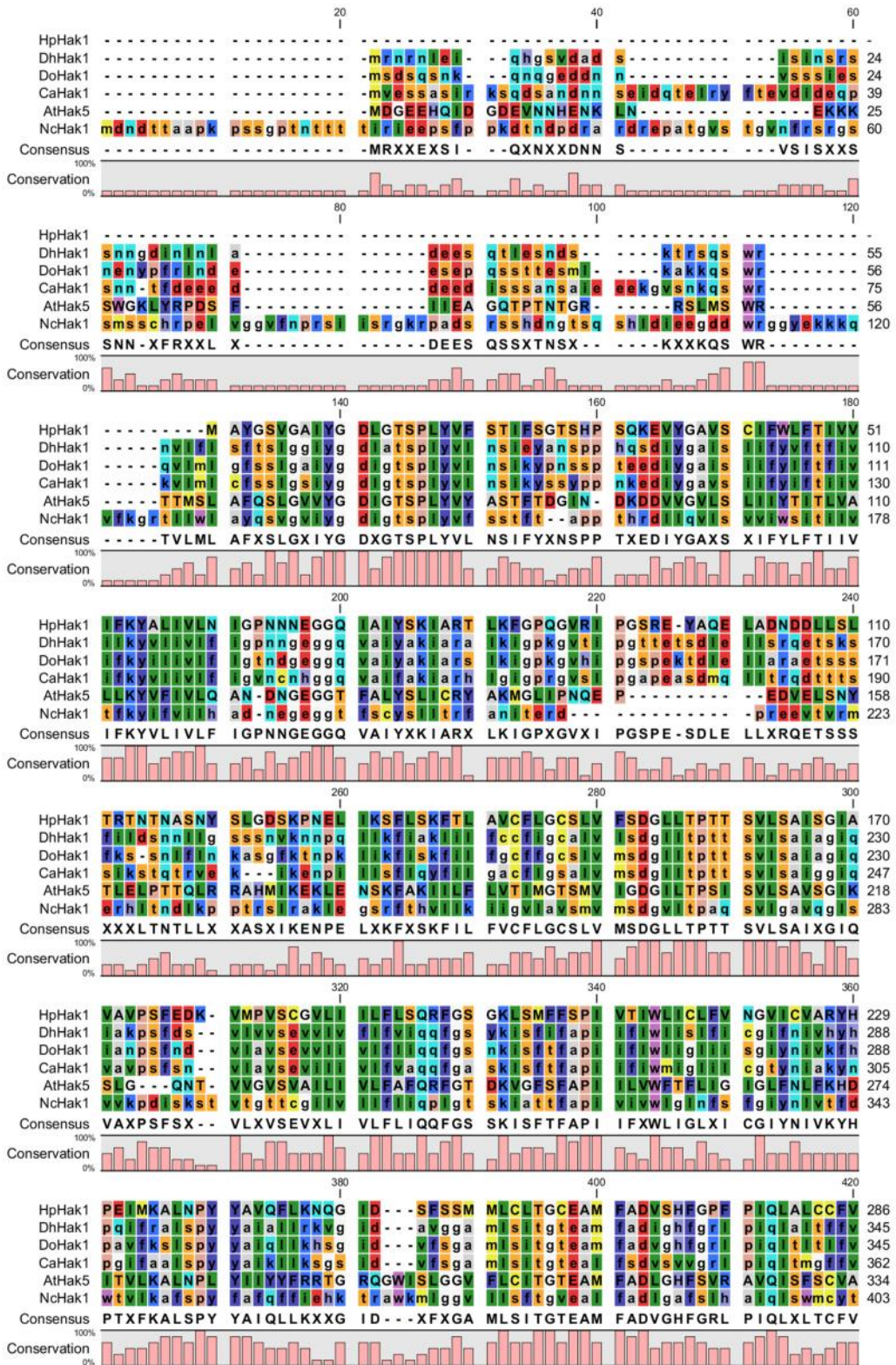
Los porcentajes de identidad se calcularon mediante BLAST para alineamientos dobles de secuencia (global). Los números entre paréntesis indican el porcentaje de similitud (porcentaje de residuos conservados). *Hp*, *Hansenula polymorpha*; *Dh*, *Debaryomyces hansenii*; *Do*, *Debaryomyces occidentalis*; *Ca*, *Candida albicans*; *At*, *Arabidopsis thaliana*; *Nc*, *Neurospora crassa*.

Tabla 8. Identidad y similitud entre *HpTrk1* y proteínas relacionadas

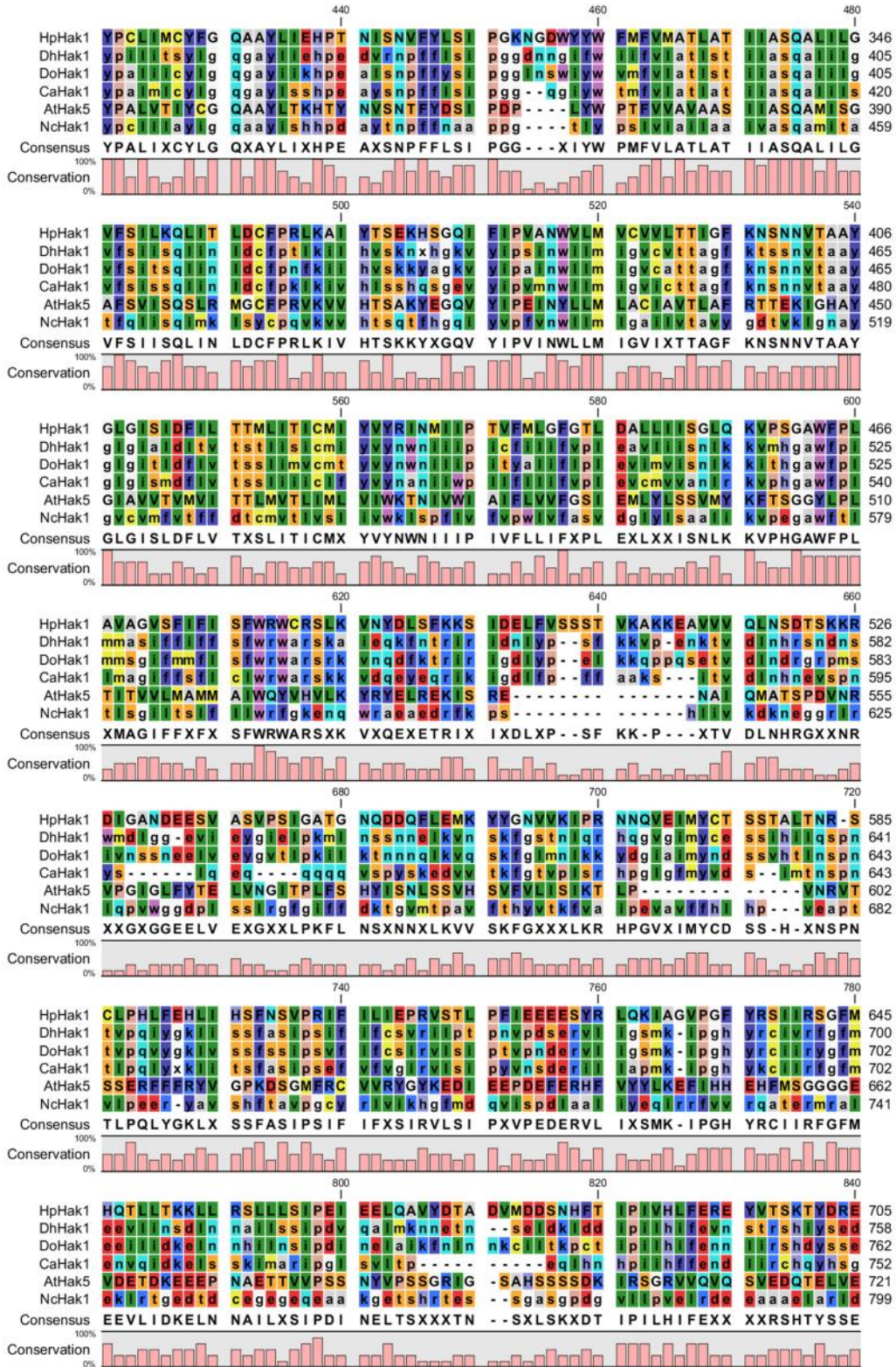
	% Identidad (% Similitud)						
	<i>ScTrk1</i>	<i>ScTrk2</i>	<i>DhTrk1</i>	<i>DoTrk1</i>	<i>CaTrk1</i>	<i>AtHkt1</i>	<i>NcTrk1</i>
<i>HpTrk1</i>	54 (68)	59 (74)	59 (72)	44 (60)	41 (54)	25 (47)	51 (70)
<i>ScTrk1</i>		56 (69)	64 (80)	57 (70)	53 (67)	26 (46)	50 (66)
<i>ScTrk2</i>			59 (74)	63 (77)	57 (74)	24 (45)	37 (54)
<i>DhTrk1</i>				61 (74)	48 (62)	25 (48)	55 (74)
<i>DoTrk1</i>					49 (63)	25 (51)	49 (65)
<i>CaTrk1</i>						26 (51)	54 (69)
<i>AtHkt1</i>							24 (44)

Los porcentajes de identidad se calcularon mediante BLAST para alineamientos dobles de secuencia (global). Los números entre paréntesis indican el porcentaje de similitud (porcentaje de residuos conservados). *Hp*, *Hansenula polymorpha*; *Sc*, *Saccharomyces cerevisiae*; *Dh*, *Debaryomyces hansenii*; *Do*, *Debaryomyces occidentalis*; *Ca*, *Candida albicans*; *At*, *Arabidopsis thaliana*; *Nc*, *Neurospora crassa*.

Ante el alto grado de identidad y similitud, se realizó un alineamiento de la secuencia aminoacídica de *HpHak1* con la proteínas homólogas estudiadas. El resultado del alineamiento se muestra en la Figura 8, donde se puede observar una amplia región conservada, próxima mayormente a la región amino-terminal de la secuencia de Hak1.



Resultados. Capítulo 1



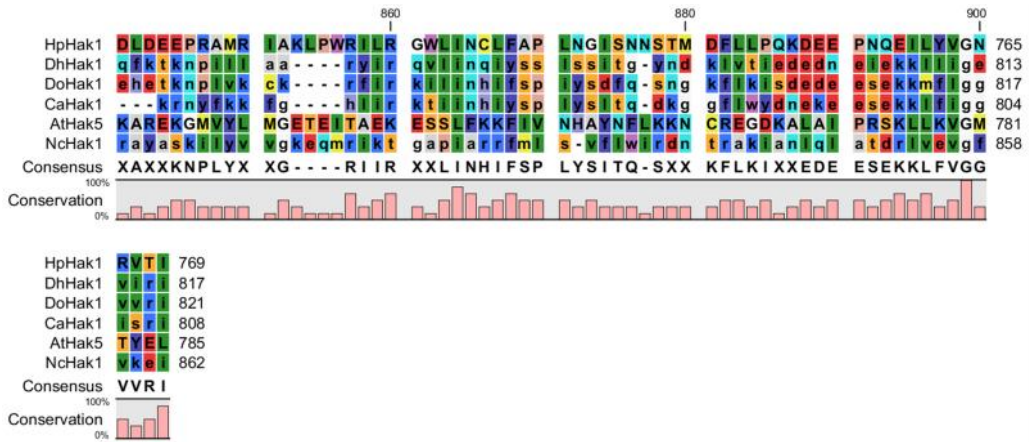
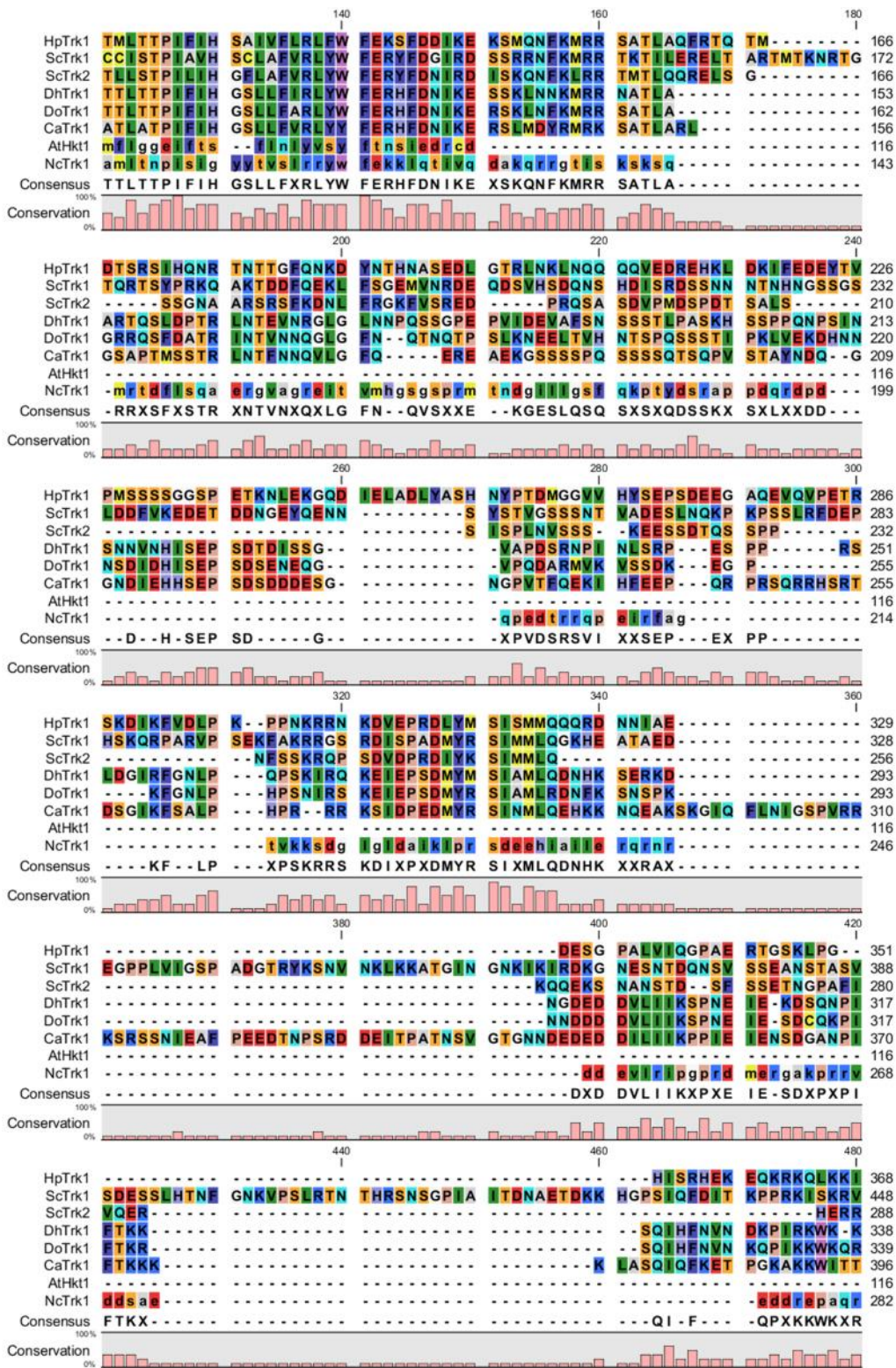


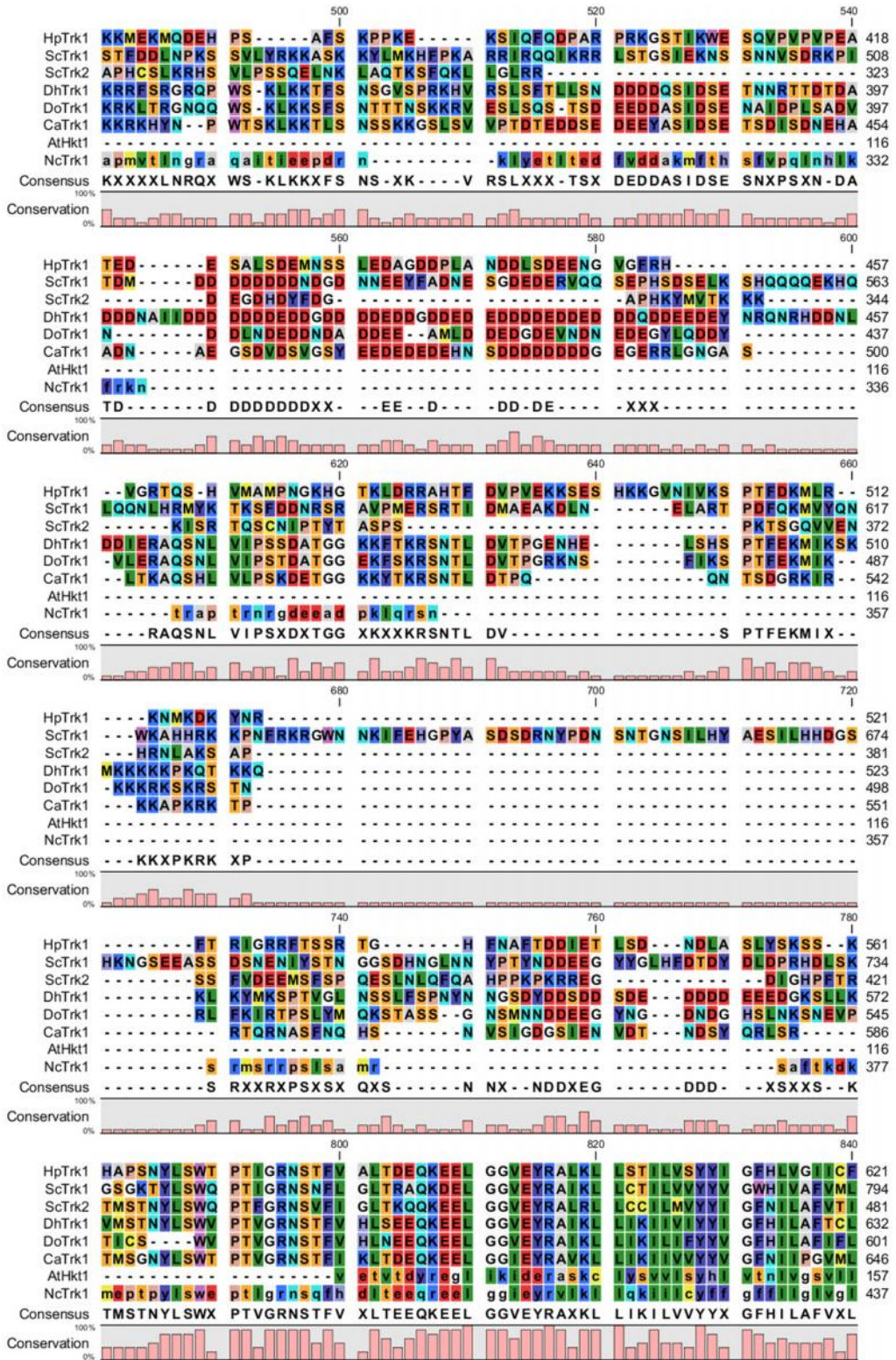
Figura 8. Alineamiento de *HpHak1* con otras proteínas relacionadas. El apilamiento se realizó mediante el programa CLC free Workbench empleando el algoritmo ClustalW. El grado de conservación se indica mediante las barras inferiores de color rosa (0-100%). Los aminoácidos aparecen coloreados de acuerdo a sus propiedades y en base al esquema de color RasMol. Hp, *Hansenula polymorpha*; Dh, *Debaryomyces hanseni*; Do, *Debaryomyces occidentalis*; Ca, *Candida albicans*; At, *Arabidopsis thaliana*; Nc, *Neurospora crassa*.

El mismo procedimiento que en el apartado anterior se llevó a cabo para el análisis de la secuencia del otro transportador de potasio de *H. polymorpha*, *HpTrk1*. El resultado del alineamiento se muestra en la Figura 9. Se puede observar cómo, al igual que ocurre con *HpHak1*, también hay una amplia región conservada, que en este caso está más cercana a la región carboxi-terminal.

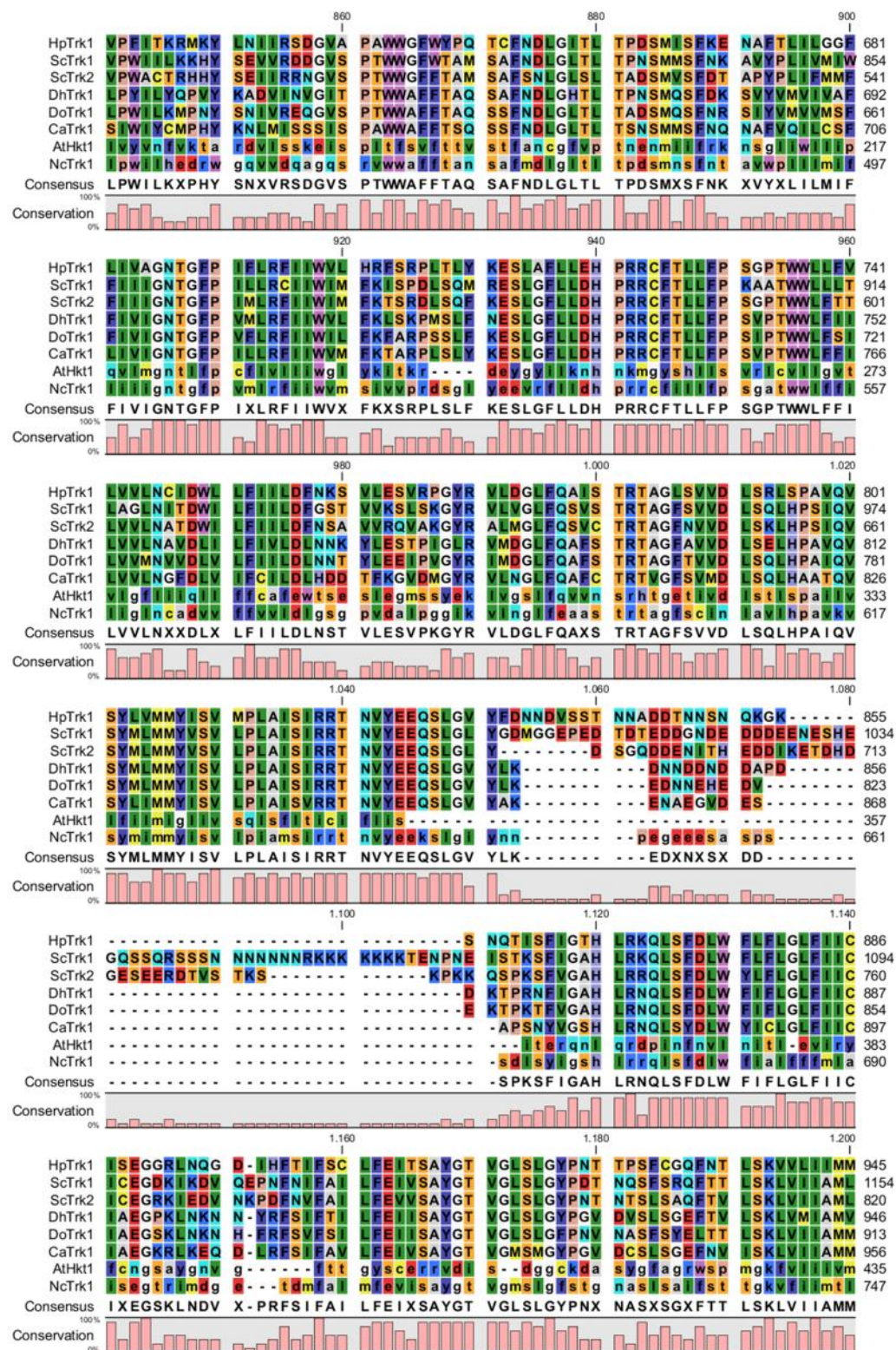


Resultados. Capítulo 1





Resultados. Capítulo 1



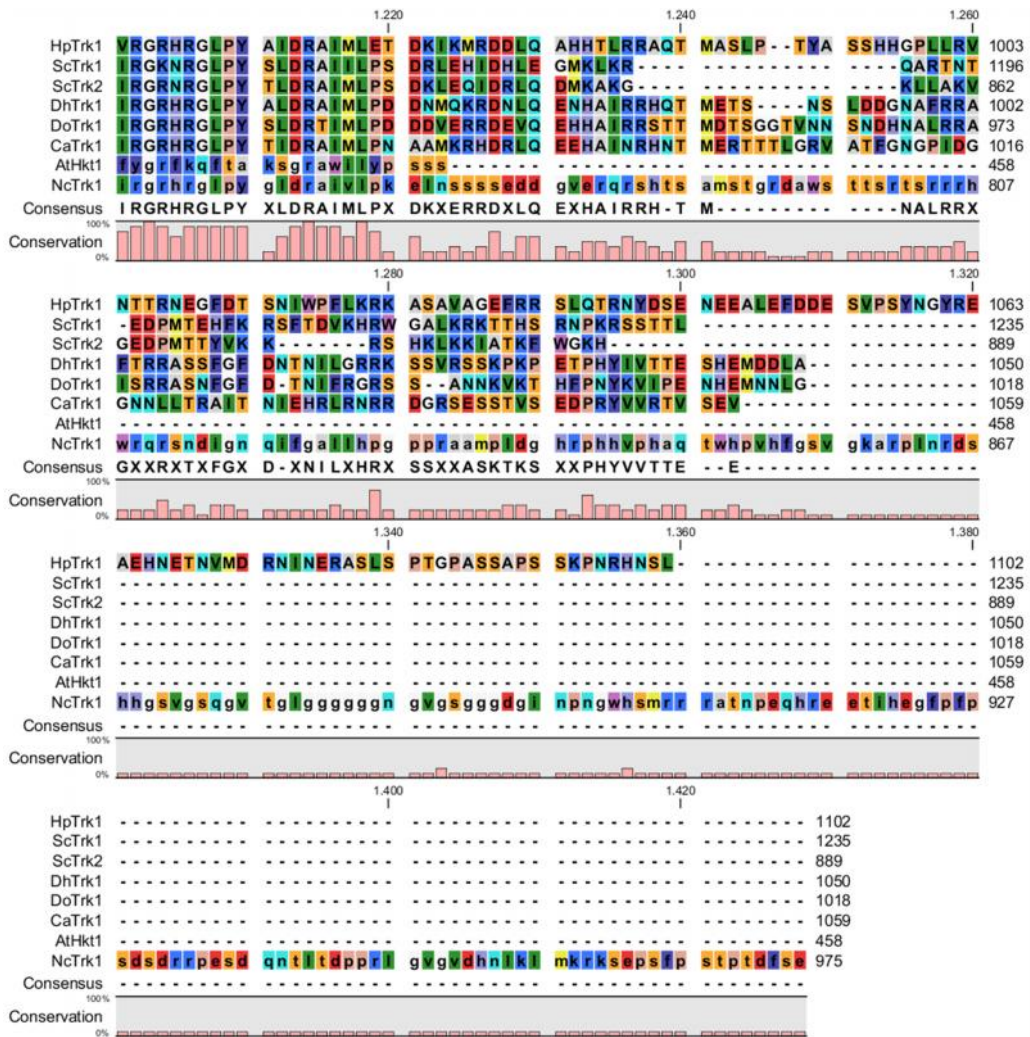


Figura 9. Alineamiento de *HpTrk1* con otras proteínas relacionadas. El apilamiento se realizó mediante el programa CLC free Workbench empleando el algoritmo ClustalW. El grado de conservación se indica mediante las barras inferiores de color rosa (0-100%). Los aminoácidos aparecen coloreados de acuerdo a sus propiedades y en base al esquema de color RasMol. Hp, *Hansenula polymorpha*; Dh, *Debaryomyces hansenii*; Do, *Debaryomyces occidentalis*; Ca, *Candida albicans*; At, *Arabidopsis thaliana*; Nc, *Neurospora crassa*.

A partir del alineamiento de las proteínas Hak1 y Trk1 de distintos organismos se obtuvieron los árboles filogenéticos que se muestran en la Figura 10 y 11. En estas representaciones se indican las posibles secuencias ancestrales comunes de las proteínas codificadas por los diferentes genes comparados (*HAK* y

TRK). Según el algoritmo empleado en la realización de estos árboles (ClustalW), tanto *HpHak1* como *HpTrk1* establecen sus mayores parentescos filogenéticos con las proteínas de las levaduras no convencionales *C. albicans*, *D. hansenii* y *D. occidentalis*, entre otras, manteniéndose más alejadas filogenéticamente de otros organismos como *N. crassa* o *A. thaliana*. Los resultados coinciden en gran medida con los datos de identidad obtenidos de la comparación de estas proteínas por separado, que se recogen en la Tabla 7 y 8.

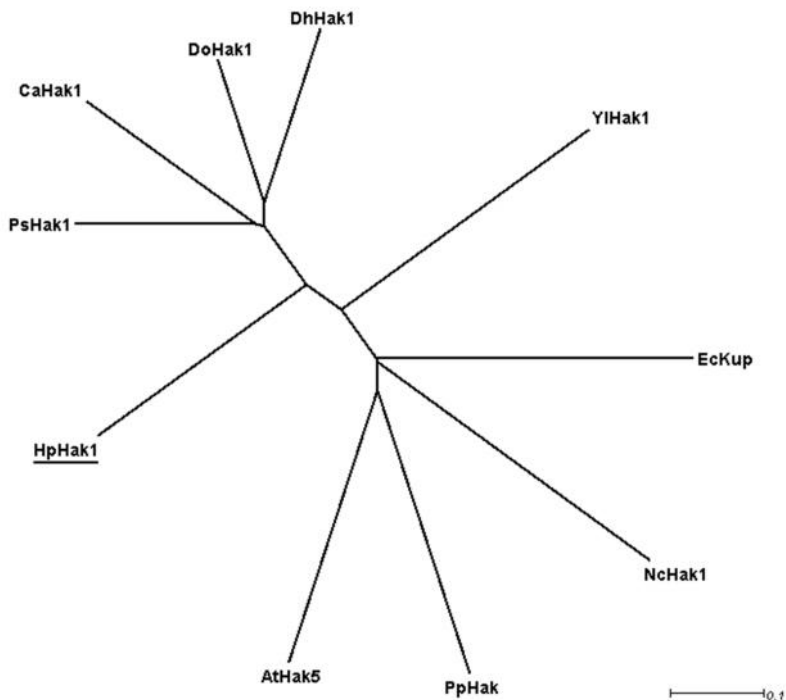


Figura 10. Árbol filogenético que relaciona *HpHak1* con proteínas similares en otros organismos. En esta figura, además de las especies estudiadas en el alineamiento de secuencias (Figura 8), se han incluido las proteínas de las especies *Escherichia coli*, *Physcomitrella patens*, *Pichia stipitis* y *Yarrowia lipolytica*.

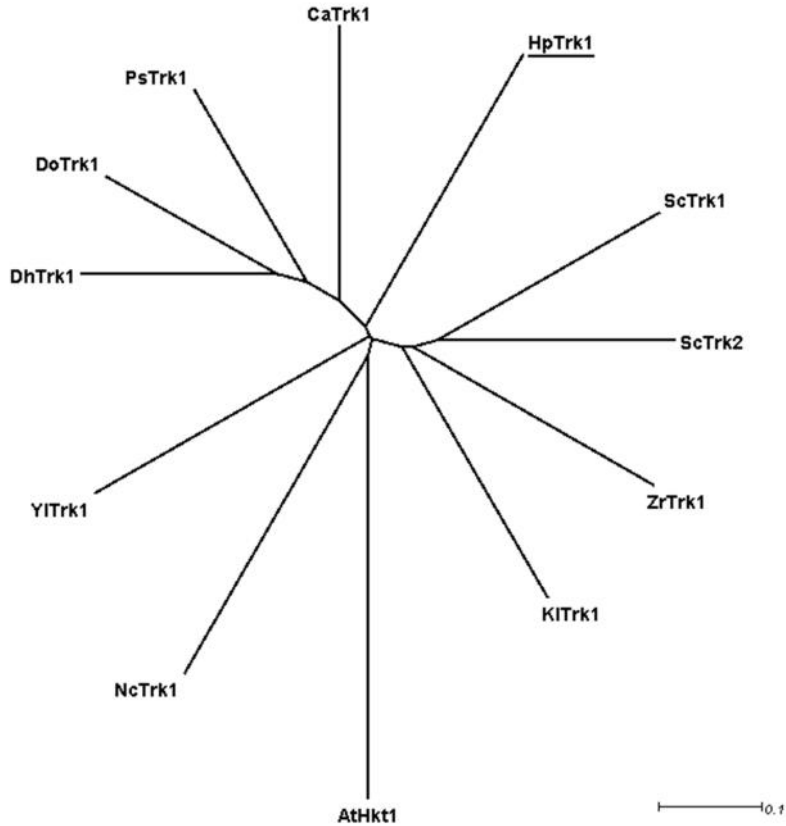


Figura 11. Árbol filogenético que relaciona *HpTrk1* con proteínas similares en otros organismos. En esta figura, además de las especies estudiadas en el alineamiento de secuencias (Figura 9), se han incluido las proteínas de las especies *Pichia stipitis*, *Yarrowia lipolytica*, *Kluyveromyces lactis* y *Zygosaccharomyces rouxii*.

Asimismo, y con el fin de verificar si la proteína *HpHak1* y *HpTrk1* comparten secuencias ancestrales comunes, se realizó finalmente un único árbol filogenético con todas las proteínas comparadas anteriormente (Figura 12). En el resultado pudimos observar una clara divergencia del origen de las proteínas Hak y Trk en general, ya que en el árbol se diferencian dos claras ramificaciones opuestas que agrupan en un extremo Hak y por otro lado Trk. Por tanto, podemos confirmar que las proteínas Hak1 y Trk1 de *H. polymorpha*, así como las del resto de los organismos comparados, tienen un origen distinto.

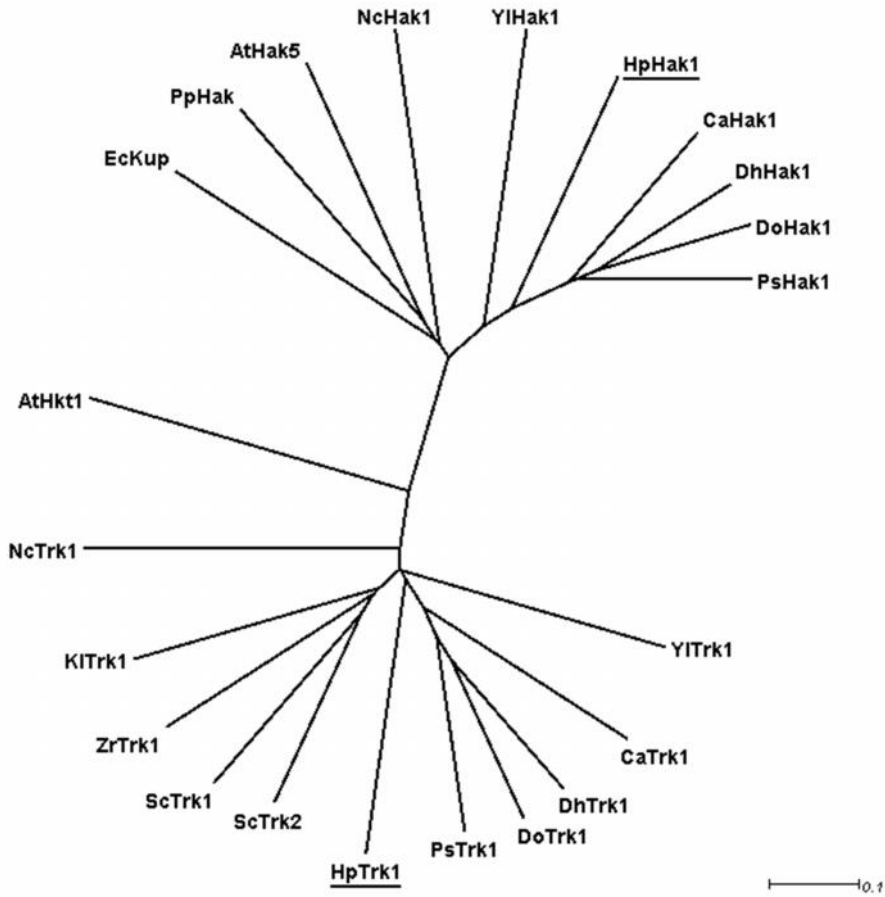


Figura 12. Árbol filogenético que relaciona las proteínas Hak1 y Trk1 de diversos organismos comparados. En la figura se han incluido todas las proteínas de las especies comparadas en los anteriores árboles filogenéticos.

Todos estos resultados indican que *TRK1* y *HAK1* de *H. polymorpha* pueden ser transportadores de potasio y por ello se continuó el estudio de estos genes. A partir de este capítulo se emplea la terminología correspondiente.

CAPÍTULO 2

**CARACTERIZACIÓN DE LA FUNCIÓN DE LOS TRANSPORTADORES
DE POTASIO HAK1 Y TRK1 EN *HANSENULA POLYMORPHA***

A través de este capítulo se estudian los transportadores de potasio Hak1 y Trk1 y su función en la homeostasis del catión en la levadura *Hansenula polymorpha*. Utilizando mutantes en los sistemas de transporte de potasio hemos realizado análisis fenotípicos de crecimiento en medio sólido y líquido, contenido y flujo de cationes, y expresión de genes.

En experimentos preliminares comprobamos que la levadura *Hansenula polymorpha* se desarrolla perfectamente en los diferentes medios (YPD, YNB e YNB-F) y en nuestras condiciones de cultivo, por lo que se utilizaron a lo largo del trabajo (Figura 13).

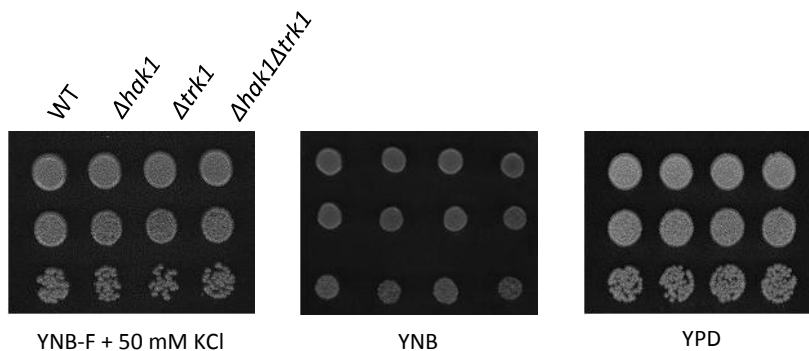


Figura 13. Comprobación del crecimiento de las cepas de *Hansenula polymorpha*, en los distintos medios y condiciones usados como control a lo largo de este trabajo. El ensayo se llevó a cabo mediante un test de goteo en el que se sembraron diluciones seriadas de cada cepa, partiendo de una suspensión celular ($A_{600nm}=0,1$). Las placas se incubaron a 37 °C durante 48-72 horas.

1. Análisis fenotípico de cepas carentes de sistemas de transporte de potasio

Con el objetivo de estudiar los requerimientos de potasio de *Hansenula polymorpha* se analizó el crecimiento en medio líquido en las cepas NCYC495 (cepa silvestre = WT) y mutantes en genes homólogos a los que en otras levaduras codifican sistemas de transporte de potasio de la membrana plasmática (*HAK* y

TRK). En un medio líquido, y cuando éste se suplementó con una concentración elevada de potasio (50 mM KCl), el crecimiento en las cepas fue prácticamente similar, mientras que en bajas concentraciones de potasio, todos los mutantes se vieron afectados siendo el doble mutante ($\Delta hak1\Delta trk1$) y el mutante simple $\Delta hak1$ los que presentaron un crecimiento claramente más lento (Figura 14).

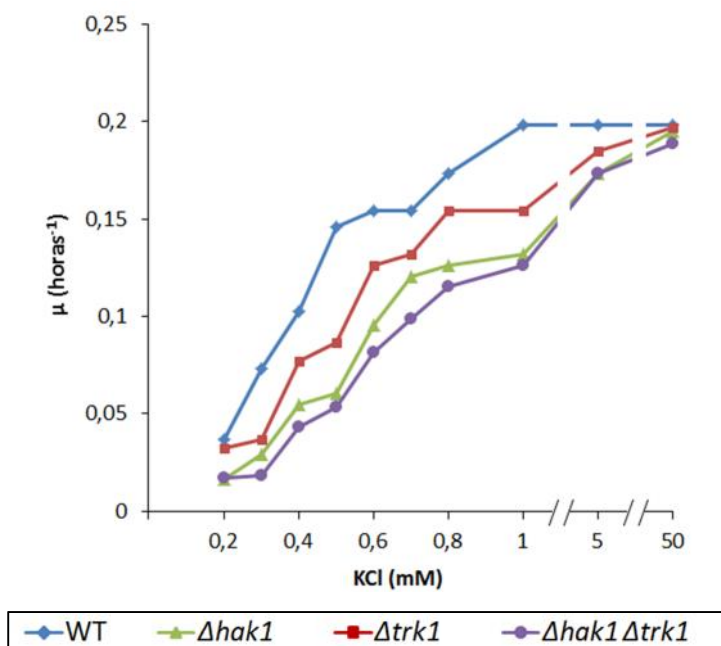


Figura 14. Crecimiento en presencia de distintas concentraciones de KCl. Las cepas NCYC495, el mutante simple $\Delta hak1$, $\Delta trk1$ y el doble mutante $\Delta hak1\Delta trk1$ crecieron a 37 °C en medio líquido YNB-F con distintas concentraciones de KCl. En la gráfica los resultados obtenidos se expresan como μ (constante específica de velocidad de crecimiento).

Ensayos complementarios se llevaron a cabo mediante test de goteo en medio sólido, donde no sólo se estudió el efecto del KCl sino también el del pH en las cepas silvestre (NCYC495), $\Delta hak1$, $\Delta trk1$, y $\Delta hak1\Delta trk1$. Como era de esperar, cuando las cepas se inocularon en bajas concentraciones de potasio se observó un menor crecimiento del mutante simple $\Delta hak1$ y del doble mutante $\Delta hak1\Delta trk1$ respecto a la cepa silvestre, mientras que el mutante simple $\Delta trk1$ presentó un comportamiento casi similar al de la cepa silvestre. Sin embargo cuando el medio

se suplementó con una concentración de 50 mM de KCl no hubo prácticamente

A) diferencias en el crecimiento entre todas las cepas (Figura 15.A). Por su parte el estudio del efecto del pH en el crecimiento de las cepas de *H. polymorpha* reveló que en todas las cepas, a igual concentración de potasio añadido, el crecimiento fue ligeramente peor demostrando que a pH ácido se incrementan los requerimientos de potasio, mientras que a pH básico el crecimiento fue similar que a pH 5,8. (Figura 15.B).

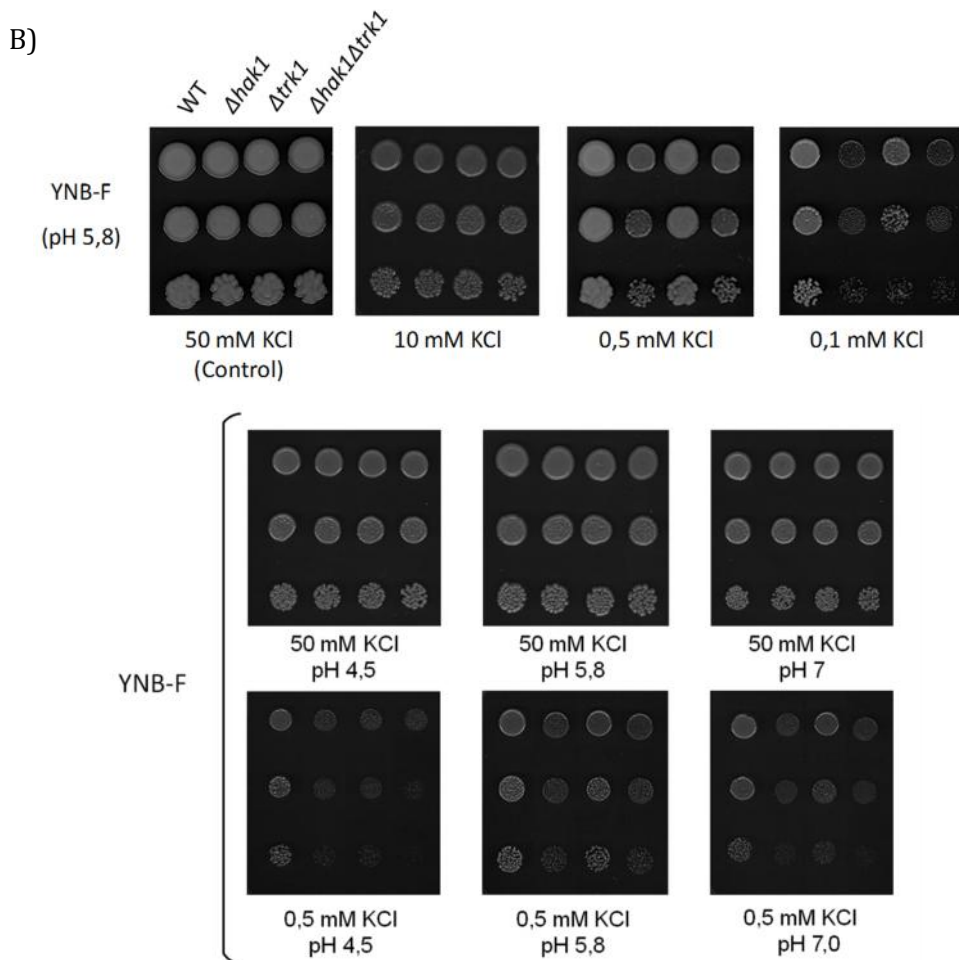
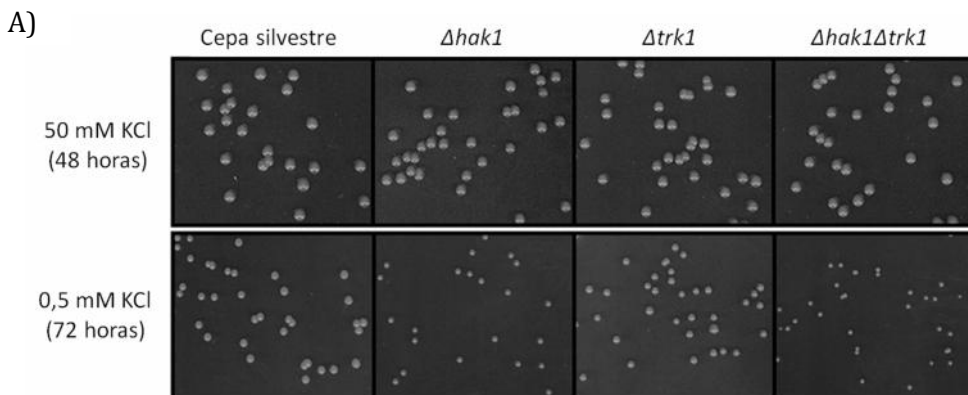


Figura 15. Efecto del potasio y del pH en el crecimiento de la cepa silvestre y cepas mutantes en el sistema de transporte Hak1 y Trk1. El ensayo se llevó a cabo mediante un test de goteo en el que se sembraron diluciones seriadas de cada cepa, partiendo de una suspensión celular ($A_{600nm}=0,1$). Se muestra el medio YNB-F a pH 5,8 suplementado con distintas concentraciones de KCl (A); un ejemplo representativo del efecto de la variación del pH en dos condiciones determinadas de potasio, 50 y 0,5 mM KCl (B). Las placas se incubaron a 37 °C durante 48-72 horas.

Al mismo tiempo y de forma complementaria, se estudió el fenotipo de las cepas mediante un estudio del crecimiento en superficie de las colonias de las distintas cepas. El tiempo de estudio de las colonias dependió de la condición estudiada, ya que mientras a las 48 horas en condición control las colonias habían adquirido un tamaño significativamente bueno para poder ser medido y comparado, en el caso de la condición a bajo potasio fueron necesarias 72 horas para realizar la medida. Los resultados mostraron cómo el tamaño de las colonias de las cepas silvestre y $\Delta trk1$ fueron superiores al resto de las cepas en las dos concentraciones estudiadas. En la condición a bajo potasio cabe destacar que el tamaño de las colonias disminuyó en todas las cepas respecto a la condición control estudiada, presentando un tamaño ligeramente mayor la cepa silvestre respecto a la cepa $\Delta trk1$, y la cepa $\Delta hak1$ respecto al doble mutante $\Delta hak1\Delta trk1$, y siendo especialmente llamativa la disminución de tamaño que experimentaron las cepas que carecían del transportador Hak1, las cuales redujeron su tamaño en gran medida (Figura 16 y Tabla 9).

El tamaño de las colonias se midió gracias al programa Image J, con el cual a partir de una medida de referencia pudimos calcular el tamaño medio de las colonias así como el tamaño mínimo y máximo de las mismas encontrado en la condición estudiada mediante el estudio del 90 % aproximadamente de las colonias crecidas en cada condición (≈ 60 colonias).



B)

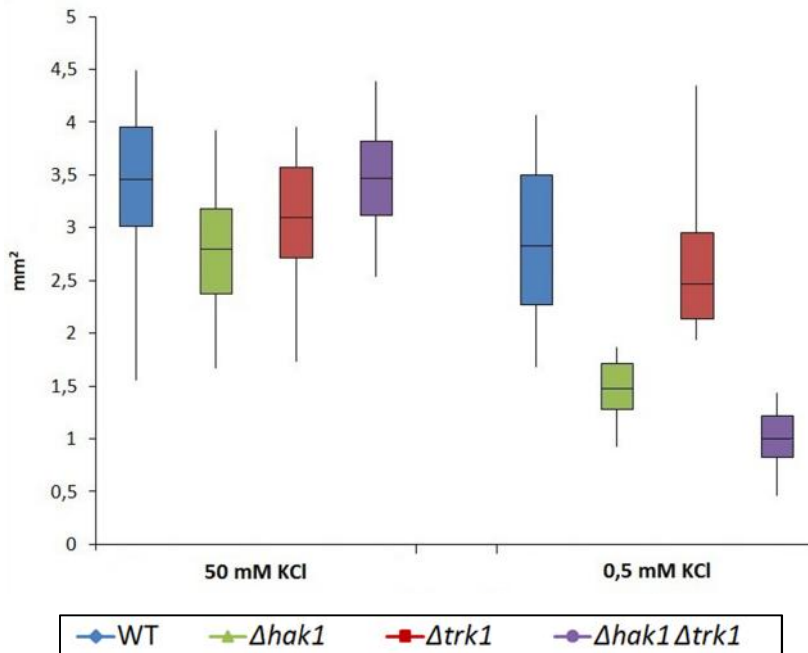


Figura 16. Tamaño de las colonias de las cepas de *Hansenula polymorpha* en diferentes condiciones de potasio. Las células crecieron en condición normal de potasio y posteriormente fueron crecidas en superficie en diferentes condiciones de potasio (0,5 y 50 mM de KCl). En las figuras se muestran: una imagen representativa del crecimiento de las colonias de las cepas (A); una gráfica resumen de los resultados obtenidos (B).

Tabla 9. Tamaño de las colonias de las cepas de *Hansenula polymorpha* en diferentes condiciones de potasio.

	Tamaño de colonia (mm ²)					
	50 mM KCl (48 horas)			0,5 mM KCl (72 horas)		
	Medio	Mínimo	Máximo	Medio	Mínimo	Máximo
Cepa silvestre	3,49 ± 0,47	1,56	4,49	2,89 ± 0,62	1,68	4,06
<i>Δhak1</i>	2,78 ± 0,40	1,67	3,92	1,50 ± 0,22	0,93	1,87
<i>Δtrk1</i>	3,15 ± 0,43	1,73	3,95	2,55 ± 0,41	1,94	4,35
<i>Δhak1Δtrk1</i>	3,48 ± 0,35	2,54	4,38	1,03 ± 0,20	0,46	1,44

* Medio: tamaño promedio calculado a partir de todas las colonias medidas; Mínimo, tamaño de la colonia más pequeña contabilizada; Máximo, tamaño de la colonia más grande contabilizada.

2. Contenido interno de potasio

Como las tasas de crecimiento de las cepas eran similares en concentraciones no limitantes de potasio (>1 mM) pero diferían a bajo potasio, se analizó el contenido interno de potasio para determinar si las cepas contrastaban en este parámetro fisiológico bajo diferentes condiciones de potasio.

Las cepas crecieron en medio YNB-F suplementado con diferentes cantidades de potasio. Tal y como se indica en el apartado de Materiales y Métodos, cuando se estudió el potasio interno en células ayunadas, el cultivo creció en medio con potasio no limitante, se centrifugó, se lavó con agua miliQ y se resuspendió en medio fresco YNB-F sin potasio añadido. El contenido interno de potasio de las cepas ayunadas se estudió tomando muestras a lo largo del período de ayuno de potasio.

Los resultados obtenidos mostraron que, en condiciones no limitantes de potasio (condición control con 50 mM KCl), no hubo grandes diferencias entre cepas, aunque el contenido de potasio interno en la cepa silvestre fue sutilmente mayor respecto a las cepas carentes de los transportadores de potasio. El contenido de K^+ de todas las cepas fue alrededor de unos 380 nmoles de potasio por miligramo de peso seco de célula, y en el caso de la cepa silvestre éste fue de 430. Por otro lado, cabe destacar que cuando se estudió el contenido en la condición a 0,5 mM de KCl, todas las cepas disminuyeron el potasio acumulado respecto a la condición control estudiada, siendo las cepas carentes del transportador Hak1 (el mutante simple $\Delta hak1$ y el doble mutante $\Delta hak1\Delta trk1$) las que presentaron un contenido interno de potasio menor respecto al resto de las cepas en la condición de potasio estudiada, llegando a alcanzar valores de 150 nmoles de K^+ por mg de peso seco de célula, mientras que la cepa silvestre y el mutante $\Delta trk1$ obtuvieron valores de 250 y 200 nmoles de K^+ por mg de peso seco de célula respectivamente (Figura 17).

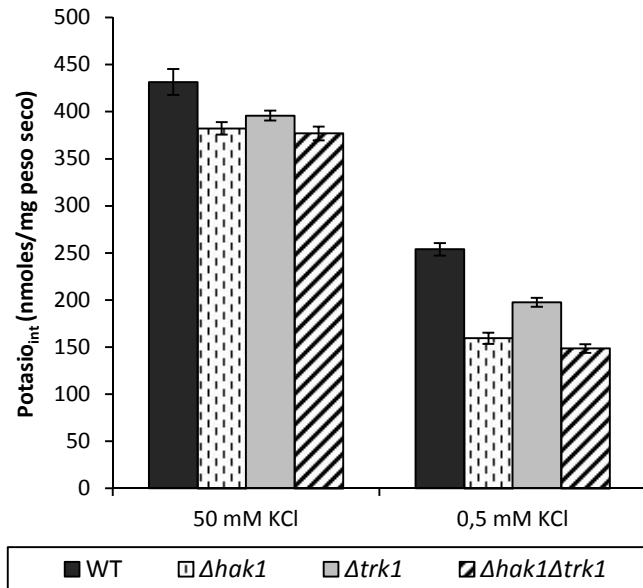


Figura 17. Contenido de potasio intracelular de la cepa NCYC495 y las cepas mutantes en el sistema de transporte Hak1 y Trk1. Las células crecieron en medio líquido YNB-F suplementado con 50 o 0,5 mM de KCl. Las barras de error representan las desviaciones típicas de tres experimentos independientes.

Asimismo, los resultados obtenidos en el estudio del contenido de potasio interno realizado a lo largo del período de ayuno de potasio mostraron que a medida que se aumentó el tiempo de ayuno de potasio, todas las cepas experimentaron una disminución de su contenido interno de potasio, pero esta disminución fue mayor en el caso de la cepa $\Delta trk1$ y la cepa silvestre. Éstas disminuyeron su contenido interno de potasio hasta valores de 75 y 125 nmoles de K^+ /mg peso seco de células respectivamente después de dos horas de ayuno de potasio (Figura 18). En el caso de las cepas carentes del transportador Hak1 ($\Delta hak1$ y $\Delta hak1\Delta trk1$), éstas experimentaron una disminución en la acumulación de potasio menor, llegando a alcanzar valores de 170 y 140 nmoles de K^+ /mg peso seco de células respectivamente.

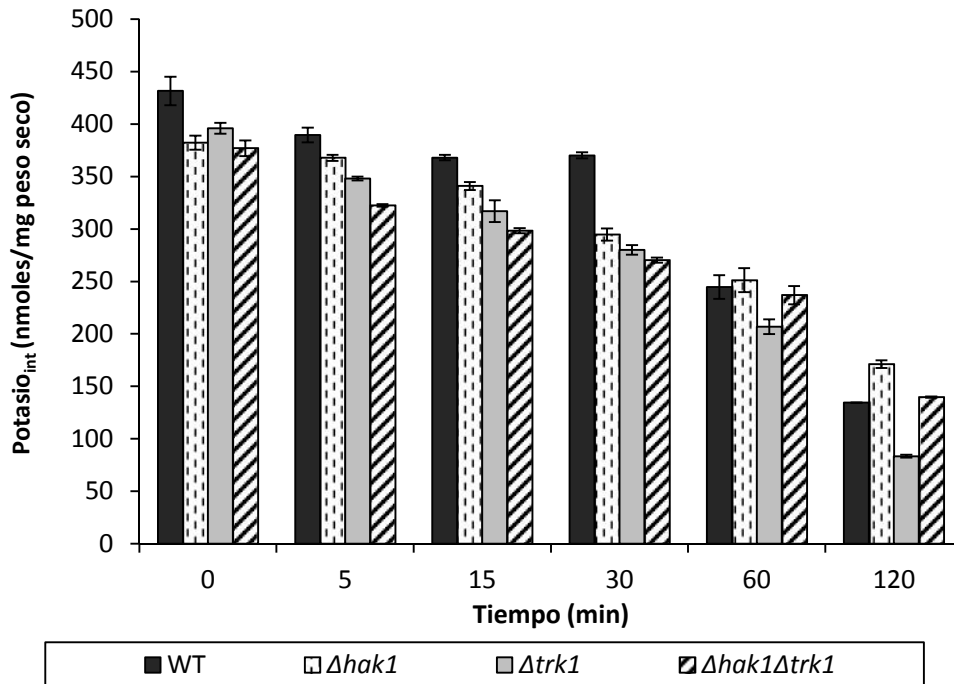


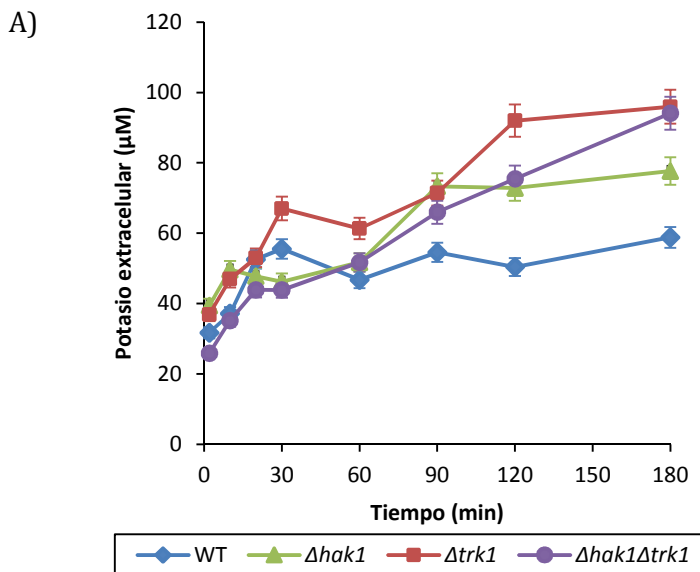
Figura 18. Contenido de potasio intracelular de las cepas de *Hansenula polymorpha* a lo largo del proceso de ayuno de potasio. Las células crecieron en medio YNB-F con 50 mM de KCl y posteriormente se transfirieron a medio sin potasio añadido, donde se tomaron muestras celulares a distintos tiempos de ayuno. El contenido intracelular de cationes fue determinado por espectrofotometría de absorción atómica (ver Materiales y Métodos para más detalle). En la figura se muestra un experimento representativo. Las barras de error representan las desviaciones típicas de las repeticiones de las muestras tomadas durante el mismo experimento.

3. Análisis de los cambios de potasio extracelular

Una aproximación al análisis de la capacidad de transporte de potasio de una cepa es analizar los cambios del contenido de potasio del medio externo donde se resuspende. Para ello, se realizaron experimentos con células crecidas en condiciones normales y con células ayunadas previamente de KCl. En el primer caso, las células de las distintas cepas crecieron en YNB-F suplementado con potasio (50 mM KCl), y luego se resuspendieron en tampón MES al que se añadió pequeñas cantidades de KCl (40 μ M), donde posteriormente se midieron los cambios del catión del medio líquido. Se observó que el contenido de potasio del

medio varió de forma similar en todos los casos, aumentando ligeramente a lo largo de tiempo indicando un flujo neto de salida del catión debido a que las cepas presentaban poca afinidad por el catión cuando crecían en potasio no limitante (Figura 19.A).

Por otro lado, cuando estudiamos la variación de potasio en el medio de las cepas ayunadas de potasio, las células crecieron en YNB-F suplementado con potasio (50 mM KCl), posteriormente fueron ayunadas de potasio durante 4 horas y luego se resuspendieron en tampón de ensayo MES suplementado con bajas concentraciones de potasio (80 μ M) donde se midieron posteriormente los cambios del catión del medio. En este caso los resultados mostraron que, mientras el contenido de potasio del medio con la cepa silvestre y la cepa $\Delta trk1$ disminuyó inmediatamente descubriendo así la gran afinidad por el potasio del sistema de transporte actuando en dichas cepas bajo condiciones limitantes del mismo; en el caso del mutante simple $\Delta hak1$ y el doble mutante $\Delta hak1\Delta trk1$ el contenido de K^+ extracelular aumentó con el tiempo, revelando que, al igual que ocurría con las células normales, estas cepas no solo no eran capaces de tomar el potasio del medio sino que no podían retener el propio catión interno, indicando así un sistema de transporte defectivo en condiciones de potasio limitado (Figura 19.B).



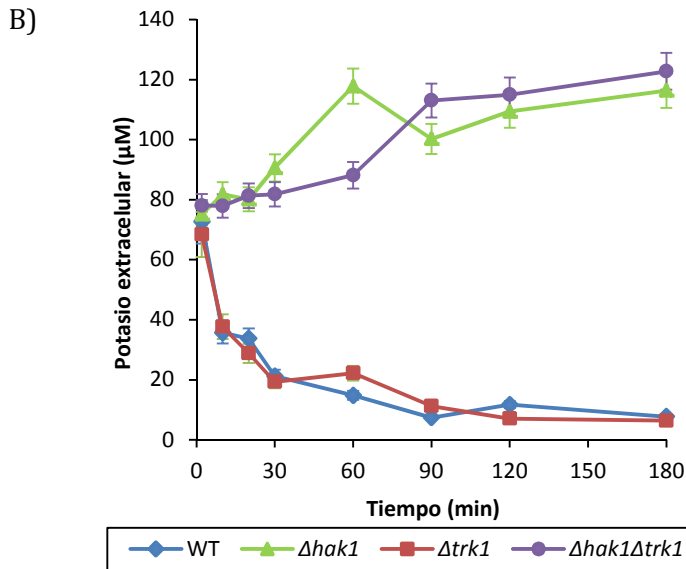


Figura 19. Variación de potasio externo producido por las cepas de *Hansenula polymorpha*. Las células crecieron con KCl 50 mM (A) o con KCl 50 mM y ayunadas de K^+ durante cuatro horas (B). A tiempo cero se resuspendieron las células con una A_{600nm} de 0,7 en tampón MES con 40 u 80 μM de KCl añadido (A y B respectivamente), y se tomaron muestras del potasio del medio externo a lo largo del tiempo durante 3 horas. Las barras de error representan las desviaciones típicas de tres experimentos independientes.

4. Estudio de los flujos de entrada de Rb^+ (K^+) y determinación de los valores cinéticos de transporte

El siguiente objetivo fue determinar el efecto de la mutación en *HAK1* y *TRK1* sobre los flujos de entrada de potasio al interior celular, así como determinar los valores de la cinética de transporte de dicho catión. Ya que por naturaleza el K^+ se encuentra presente en el interior celular, se utilizó Rb^+ , como un análogo del transporte de potasio, para poder calcular la velocidad inicial de entrada del catión y determinar los valores cinéticos de su transporte.

En un primer paso, se estudió la entrada de Rb^+ a la célula mediante su adición al medio de cultivo. El ensayo se llevó a cabo en células crecidas en dos condiciones diferentes, YNB-F con 50 o 0,5 mM de potasio (KCl). Se añadió la cantidad de 10 mM de RbCl al medio y se tomaron muestras de la entrada del catión durante un tiempo determinado (30 minutos). Las medidas se llevaron a

cabo mediante espectrofotometría de absorción atómica (ver Materiales y Métodos).

En la primera condición, cuando las células crecieron en condición control con 50 mM de KCl, las cepas mostraron un transporte de rubidio similar (Figura 20A). No obstante, cuando las células crecieron en cantidades inferiores de potasio (0,5 mM KCl), las cepas mostraron un transporte de rubidio muy diferente. Por un lado, la cepa silvestre y el mutante $\Delta trk1$ mostraron un transporte de rubidio mayor y más rápido, mientras que, por otro lado, las cepas $\Delta hak1$ y $\Delta trk1\Delta trk1$ presentaron un transporte inferior y más lento (Figura 20B). Estos resultados obtenidos sugirieron que, las cuatro cepas tienen capacidad de transporte de rubidio (potasio) y lo transportan de modo eficiente cuando éste es añadido al medio (Figura 20A), y que destacan entre ellas, las cepas que disponen del sistema de transporte Hak1, la cepa silvestre y $\Delta trk1$, que presentan un transporte de rubidio más eficaz a concentraciones escasas de potasio (Figura 20B).

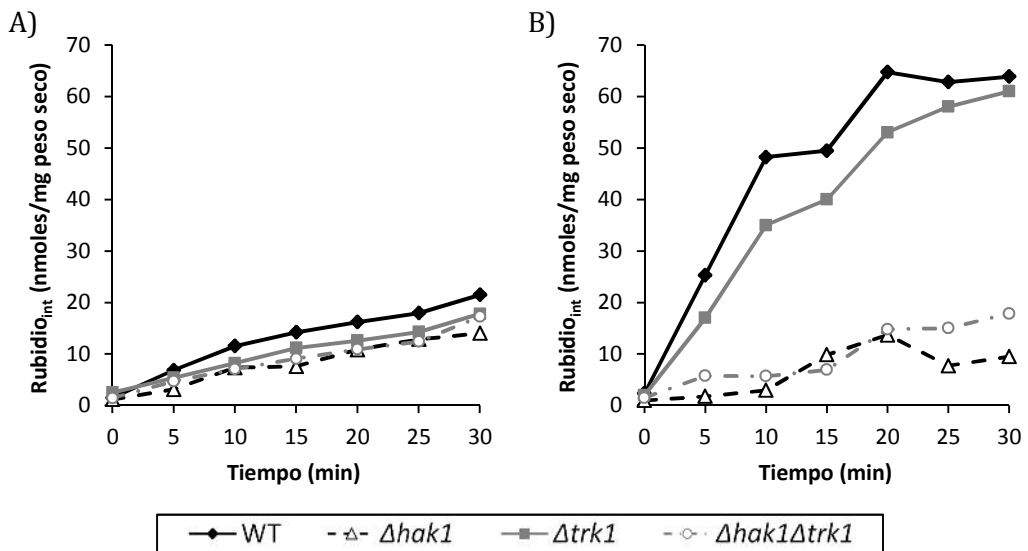


Figura 20. Entrada de rubidio en las cepas. Las células crecieron a 37 °C en dos condiciones diferentes de potasio: crecidas con 50 mM de KCl (condición control) (A) o crecidas con 0,5 mM de KCl (B). A tiempo cero se añadió RbCl 10 mM y se tomaron distintas muestras a lo largo del tiempo que fueron analizadas por espectrofotometría de absorción atómica. Los resultados obtenidos se midieron en nmoles de rubidio por mg de peso seco de células. En la figura se muestra un experimento representativo de cada condición estudiada.

A partir de ensayos independientes de entradas de Rb^+ , como los reflejados en la Figura 20 y utilizando diferentes concentraciones de $RbCl$, se pudieron hallar las velocidades de transporte y calcular los valores de las constantes cinéticas (K_m y V_{max}) correspondientes al transporte del catión en células ayunadas de potasio (2 horas). Para ello las células crecieron en condición control, fueron ayunadas en medio YNB-F sin potasio añadido durante dos horas y posteriormente fueron resuspendidas en tampón MES (glucosa 2%), donde se realizaron las diferentes entradas de rubidio. La elección de estudiar esta condición de ayuno de potasio se debió a que, tal y como se demostró en el ensayo anterior, en las condiciones con potasio limitado es donde las cepas presentan mayores diferencias en el flujo de entrada de rubidio, por lo que se decidió estudiar la condición extrema, cohibiendo a las cepas de potasio.

En la Tabla 10 se recogen los valores cinéticos para el transporte de rubidio, calculados tanto en la cepa silvestre como en los mutantes de sistemas de transporte de potasio cuando fueron sometidas a ayuno de potasio (2 horas). Se puede observar como los resultados fueron muy diferentes entre las cepas ya que tanto la velocidad máxima de entrada de rubidio como la afinidad por este catión se mostraron superiores en la cepa silvestre respecto a las demás, mostrando una diferencia mayor con el mutante simple $\Delta hak1$ y el mutante doble $\Delta hak1\Delta trk1$ que con la cepa $\Delta trk1$.

Los valores obtenidos en la condición de ayuno de potasio fueron particularmente espectaculares. Se determinó que aquellas cepas que disponían del transportador Hak1 (la cepa silvestre y el mutante $\Delta trk1$) tenían una velocidad máxima de hasta 4 veces mayor que aquellas cepas que carecían de dicho transportador ($\Delta hak1$ y $\Delta hak1\Delta trk1$) y una constante de afinidad 100 veces menor. Merece la pena señalar que la cepa $\Delta trk1$ presentó la mayor V_{max} , incluso mayor que la cepa silvestre. Todos estos resultados indican que las células ayunadas de las cepas que disponen del transportador Hak1 presentan un proceso de transporte de rubidio de alta afinidad que está ausente en las cepas que carecen de él.

Tabla 10. Constantes cinéticas del transporte de Rb⁺ en las cepas silvestre y los mutantes de sistemas de transporte de potasio en ayuno de potasio.

	Células ayunadas*	
	Km (mM)	Vmax (nmol/mg/min)
WT	0,01 ±0,001	12,5 ±1,0
<i>Δhak1</i>	1,7 ±0,05	3,5 ±0,5
<i>Δtrk1</i>	0,01 ±0,001	15 ±0,7
<i>Δhak1Δtrk1</i>	1,5 ±0,04	4,5 ±0,2

*Las células crecieron con KCl 50 mM y ayunadas de potasio durante 2 horas. Posteriormente las células se resuspendieron en tampón MES y se añadieron diferentes concentraciones de RbCl.

Tras los resultados obtenidos se realizó un estudio cinético de la cepa silvestre y la cepa mutante *Δhak1*, aquellas en las que se observaron diferencias más relevantes en el transporte de rubidio, crecidas en dos condiciones diferentes de crecimiento. Por un lado se estudiaron las cepas crecidas con KCl 50 mM y además, se estudiaron las cepas crecidas en 0,5 mM de KCl (Tabla 11).

Los resultados obtenidos en esta ocasión no fueron tan espectaculares como los obtenidos en la condición de ayuno pero sirvieron para confirmar los anteriores. Se observó que, en las dos condiciones estudiadas, la cepa silvestre mostró de nuevo una mayor afinidad por el potasio que la cepa *Δhak1*, siendo esta afinidad del orden de casi 9 y 17 veces mayor en la condición control y en presencia de 0,5 mM KCl respectivamente. Por otro lado, respecto a la velocidad máxima, se observó que, cuando las cepas crecieron con 0,5 mM de KCl, la cepa silvestre presentó una velocidad doble que la de la cepa carente del transportador Hak1, mientras que cuando las dos cepas crecieron en la condición control las velocidades de ambas fueron similares.

Tabla 11. Constantes cinéticas del transporte de Rb⁺ en las cepas silvestre y los mutantes de sistemas de transporte de potasio

	Crecidas en 50 mM KCl*		Crecidas en 0,5 mM KCl*	
	Km (mM)	Vmax (nmol/mg/min)	Km (mM)	Vmax (nmol/mg/min)
WT	1,44 ±0,04	3,7 ±0,1	0,6 ±0,02	10 ±1,0
<i>Δhak1</i>	12,5 ±0,5	5,55 ±0,2	10 ±0,5	5 ±0,5

*Las células crecieron en 50 o 0,5 mM de KCl. Posteriormente las células se resuspendieron en tampón MES y se añadieron diferentes concentraciones de RbCl.

5. Análisis de expresión de *HAK1* y *TRK1*

Con el fin de aproximarnos a la importancia relativa de cada transportador ante diferentes condiciones celulares y obtener información sobre la posible regulación transcripcional, analizamos la expresión de ambos genes en medios con o sin limitación de potasio mediante qRT-PCR. Para ello, primero crecimos las células de la cepa silvestre en medio YNB-F con KCl 50 mM, se ayunaron de potasio durante diferentes tiempos (30-240 minutos), y se realizó un análisis de expresión mediante qRT-PCR. En presencia de concentraciones adecuadas de potasio (50 mM KCl), observamos que la expresión de *HAK1* era similar a la de *TRK1*, pero esta situación cambiaba completamente al someter a las células a una limitación de potasio (ayuno de K⁺). En esta condición, la expresión de *HAK1* aumentaba significativamente (Figura 21), lo que sugería una mayor implicación de esta proteína en el transporte de potasio en condiciones deficientes del mismo. En la Figura 21 se observa cómo los niveles de *HAK1* alcanzaron su valor máximo tras someter a los cultivos a dos horas de ayuno de potasio y que este valor se mantuvo estable cuando la condición de ayuno se mantuvo durante varias horas más, mientras que, por otro lado, el valor de expresión de *TRK1* permaneció prácticamente invariable en las condiciones estudiadas.

Asimismo, se estudió el efecto del potasio sobre la expresión en las células ayunadas añadiendo para ello, posteriormente al tratamiento de ayuno de 4 horas, 50 mM de KCl y analizando la expresión de los genes en esa condición (Figura 21). Comprobamos cómo, mientras que la expresión de *TRK1* permaneció de nuevo prácticamente inalterable, la expresión de *HAK1* disminuyó inmediatamente hasta alcanzar los niveles de expresión de la condición control en menos de 30 minutos. Estos resultados mostraron y confirmaron la regulación transcripcional de *HAK1*, y no de *TRK1*, sugiriendo la importancia de *HAK1* en el transporte de potasio en *H. polymorpha*.

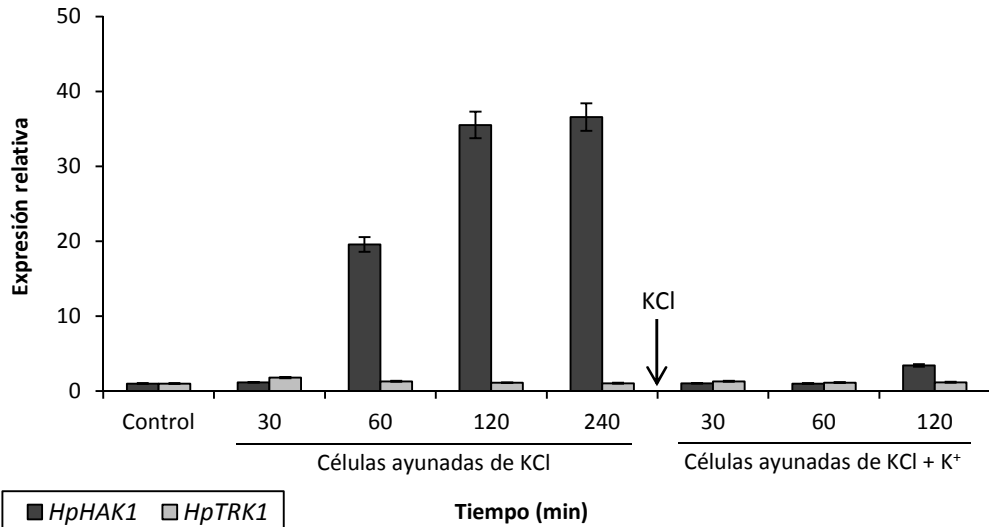


Figura 21. Expresión relativa de *HpHAK1* y *HpTRK1* en diferentes condiciones. Se determinó el nivel de expresión de *HpHAK1* y *HpTRK1* por qRT-PCR y los resultados se expresan como veces que incrementa la cantidad de transcrito respecto a la condición control. Las células de *H. polymorpha* se cultivaron en medio YNB-F con KCl 50 mM (control) y posteriormente fueron sometidas a diferentes condiciones y tiempos de ayuno de potasio que se indican en la parte inferior del eje horizontal. Por un lado las células fueron ayunadas de potasio y se tomaron muestras del transcrito a lo largo del tiempo de ayuno durante 4 horas, y por otro lado, tras las 4 horas de ayuno se le añadió KCl 50 mM y se analizaron los niveles de expresión en muestras recogidas a los tiempos indicados durante 2 horas. Las barras de error corresponden a las desviaciones típicas calculadas a partir de 3 repeticiones biológicas independientes.

De manera adicional, se analizó la expresión de los genes *HAK1* y *TRK1* en las distintas cepas de *H. polymorpha* ($\Delta hak1$ y $\Delta trk1$) cuando estas fueron crecidas en presencia de distintas concentraciones de potasio (50, 3 y 0,5 mM). Se partió de la expresión de los genes de la cepa silvestre en la condición a 50 mM KCl como control y comparación de los niveles de los transcritos.

En la Figura 22 se representan los resultados obtenidos. Analizando los datos podemos observar que las cepas estudiadas en las que el gen *HAK1* está presente, éste muestra un incremento en su expresión respecto a la de la cepa silvestre en la condición control cuando el potasio en el medio disminuye. Merece la pena señalar que, este incremento fue más evidente en el caso de la cepa $\Delta trk1$ cuando el potasio del medio fue de 0,5 mM, alcanzando *HAK1* los mismos niveles

de expresión que la cepa silvestre cuando ésta fue ayunada de potasio durante 2 horas. Por otro lado, observamos de nuevo como el gen *TRK1* no mostró variaciones significativas en su expresión.

Los resultados obtenidos confirmaron que, mientras que el gen *TRK1* no está regulado transcripcionalmente, al menos de forma importante, el gen *HAK1* si tiene regulación transcripcional y que la interrupción del gen *TRK1* (en la cepa $\Delta trk1$) de alguna forma estimula la expresión relativa de *HAK1*.

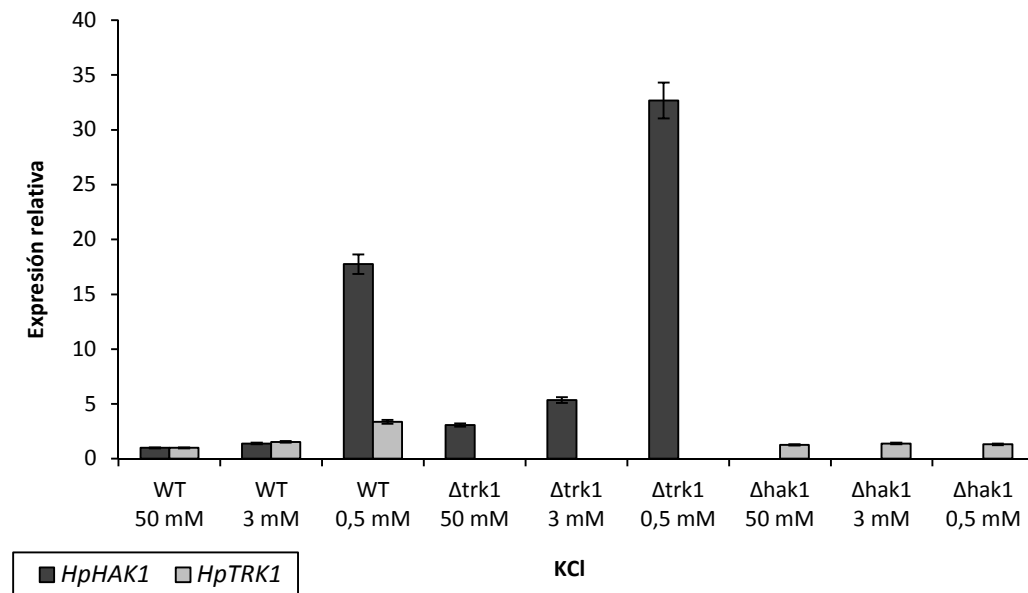


Figura 22. Expresión relativa de *HpHAK1* y *HpTRK1* en distintas cepas y diferentes condiciones de potasio. Las células de *H. polymorpha* se cultivaron en medio YNB-F con 50 mM (condición control), 3 mM o 0,5 mM de KCl y se determinó el nivel de expresión de *HAK1* y *TRK1* por qRT-PCR. Los resultados se expresan como veces que incrementa la cantidad de transcrito respecto a la cepa silvestre en la condición control. Las barras de error corresponden a las desviaciones típicas calculadas a partir de 3 repeticiones biológicas independientes.

CAPÍTULO 3

**ANÁLISIS DE LA FUNCIÓN DE LOS TRANSPORTADORES DE
POTASIO HAK1 Y TRK1 EN LA HOMEOSTASIS DE
SODIO/LITIO EN *HANSENULA POLYMORPHA***

En este tercer capítulo se analiza la función que tienen los transportadores de potasio Hak1 y Trk1 en la homeostasis de cationes tóxicos como son el sodio y el litio en la levadura *Hansenula polymorpha*. Para ello se realizaron análisis fenotípicos de crecimiento en medio sólido y líquido, contenido y flujo de cationes, y expresión de genes.

Algunos de los experimentos se realizaron en presencia de litio en lugar de con sodio, ya que este último es muy abundante en los ecosistemas naturales y el litio, más fácil de analizar, es considerado un análogo tóxico de sodio. Los ensayos se realizaron tanto en medio YPD como en medio YNB e YNB-Formedium, y los resultados obtenidos fueron cualitativamente iguales en todos los medios empleados. A lo largo de este capítulo se muestran gráficas obtenidas a partir de ensayos realizados en los diferentes medios.

1. Análisis fenotípico de cepas carentes de sistemas de transporte de potasio en presencia de sales

Con el fin de estudiar el efecto de las sales sobre el crecimiento de *H. polymorpha*, se analizó el efecto de cationes tóxicos como el litio y el sodio mediante test de goteo en medio sólido. Cuando el medio se suplementó con una concentración elevada de sodio (0,7 M) o litio (10 mM) se observó un crecimiento muy similar en la cepa silvestre y en la cepa hak1, que fue ligeramente más sensible, mientras que el mutante $\Delta trk1$ mostró una alta sensibilidad a dichos cationes. También es de resaltar que el crecimiento del doble mutante se recuperó parcialmente en comparación con el del mutante simple $\Delta trk1$ tanto en sodio como en litio (Figura 23).

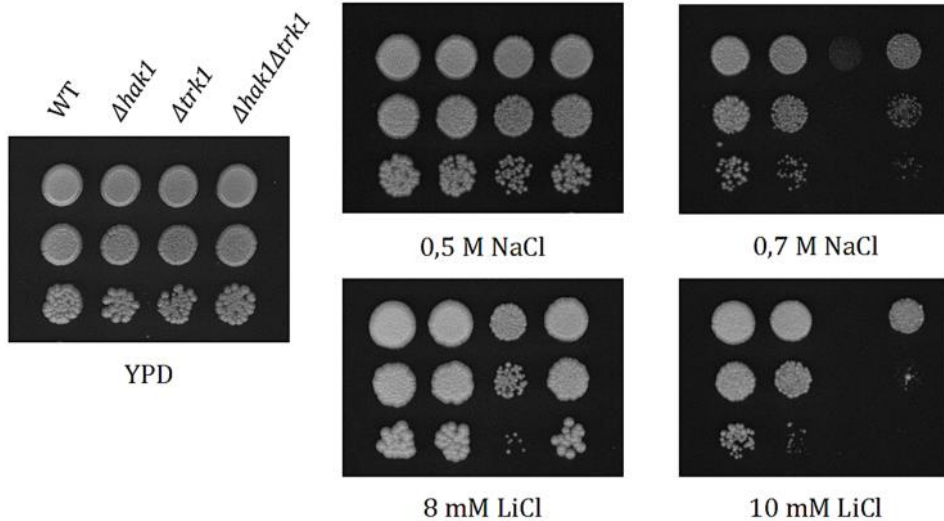


Figura 23. Efecto del sodio y el litio en el crecimiento de las cepas de *H. polymorpha*. El ensayo se llevó a cabo mediante un test de goteo en el que se sembraron diluciones seriadas de cada cepa, partiendo de una suspensión celular ($A_{600nm}=0,1$). Se realizó en medio YPD suplementado con distintas concentraciones de NaCl o LiCl. Las placas se incubaron a 37 °C durante 48-72 horas.

De forma complementaria se estudió el efecto de las sales sobre el crecimiento de las cepas en medio líquido. Las cepas crecieron en medio YNB-F con 50 mM de potasio (KCl) y suplementadas con diferentes concentraciones de sodio (de 0 a 1,1 M NaCl). Cuando el medio se suplementó con una baja concentración de sodio, el crecimiento en las cepas fue prácticamente similar, mientras que a elevadas concentraciones del catión, el mutante simple $\Delta trk1$ presentó un crecimiento claramente más lento respecto al resto de las cepas (Figura 24), confirmándose de esta manera la observación realizada previamente en placas. Igualmente, el mutante $\Delta hak1$ fue ligeramente más sensible que la cepa silvestre y el doble mutante $\Delta hak1\Delta trk1$ presentó un crecimiento mejor que el de la cepa $\Delta trk1$.

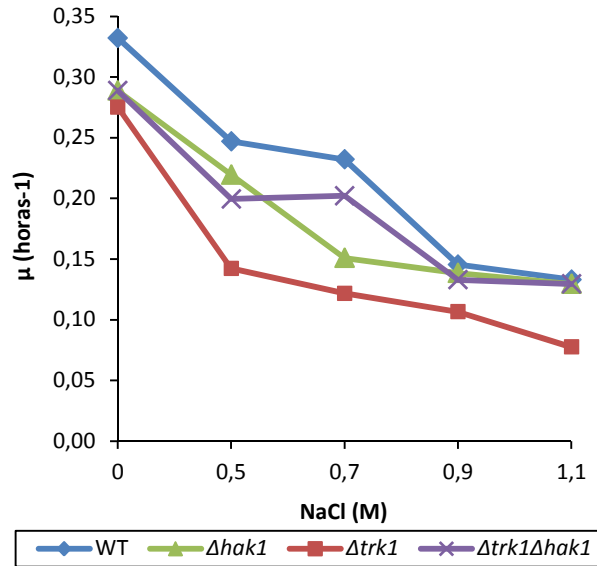


Figura 24. Crecimiento en presencia de distintas concentraciones de sodio. Las cepas NCYC 495, el mutante simple $\Delta hak1$, $\Delta trk1$ y el doble mutante $\Delta hak1\Delta trk1$ crecieron a 37 °C en medio líquido YNB-F suplementado con 50 mM de KCl y distintas concentraciones de NaCl. En la gráfica los resultados obtenidos se expresan como μ (constante específica de velocidad de crecimiento).

2. Contenido interno de sodio

Como las tasas de crecimiento de las distintas cepas en medio líquido así como el fenotipo mostrado en medio sólido a altas concentraciones de sodio eran diferentes, se analizó el contenido interno de sodio o litio cuando fueron crecidas en presencia de estos cationes tóxicos para determinar si las cepas diferían en la acumulación de los mismos.

Las cepas crecieron en medio YPD suplementado con una cantidad determinada de sodio (0,5 M NaCl), apropiada para que las cepas crecieran de forma adecuada y a la vez mostraran diferencias en el fenotipo. Se estudió tanto el contenido de sodio acumulado como el contenido interno de potasio.

Los resultados mostraron que cuando las cepas crecen en YPD, un medio completo, no hay diferencias en la acumulación de potasio entre ellas (Figura 25A). Sin embargo, cuando las cepas fueron crecidas en medio YPD

suplementado con sodio, se observaron diferencias significativas tanto en la acumulación de potasio como en la de sodio. En este caso, observamos que la cepa *Δtrk1* destacó entre las demás, ya que contenía una mayor cantidad de sodio y, a la vez, acumuló menor cantidad de potasio interno respecto al resto de cepas lo que puede estar relacionado con su mayor sensibilidad (Figura 25B).

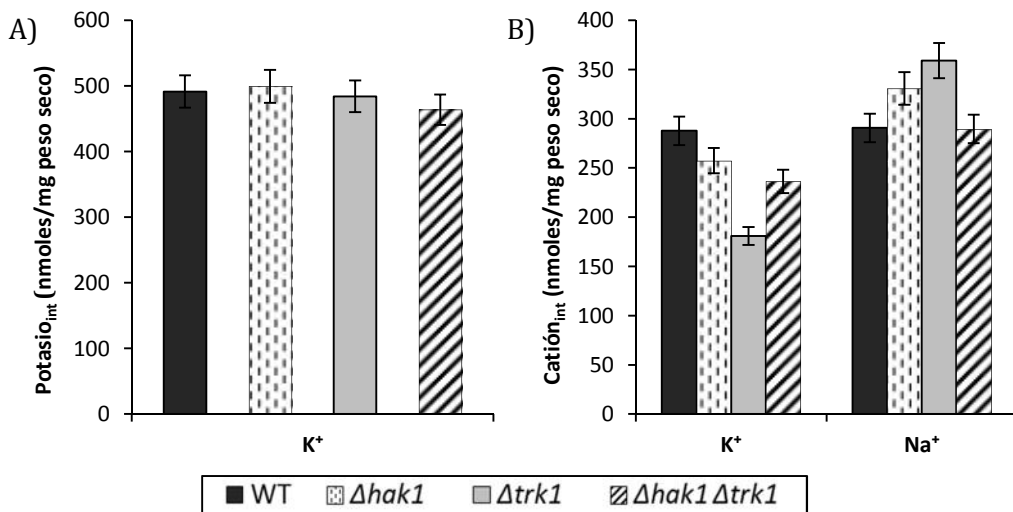


Figura 25. Contenido de potasio y sodio intracelular de la cepa NCYC 495 y las cepas mutantes en el sistema de transporte Hak1 y Trk1. Las células crecieron en medio líquido YPD (A) o YPD suplementado con 0,5 M de sodio (B). Las barras de error representan las desviaciones típicas de tres experimentos independientes.

3. Análisis de los cambios de sodio/litio extracelular.

Recientemente se ha mostrado la existencia de sistemas de alta afinidad por sodio en algunos mohos y levaduras (Benito *et al.*, 2012). Para analizar si este es el caso en *H. polymorpha*, y de igual manera que en el capítulo anterior (Capítulo 2), se determinó la capacidad de absorción de sodio y litio con alta afinidad a partir de los cambios en los valores externos del catión. Se investigó el efecto de la mutación en *HAK1* o en *TRK1* sobre el transporte de cationes tóxicos, analizando los cambios del contenido de sodio o litio del medio donde se resuspendieron las cepas. Para ello, las células crecieron en YNB-F suplementado

con potasio (50 mM), fueron ayunadas de KCl durante 2 horas y luego se resuspendieron en tampón MES con glucosa (2%) con bajas concentraciones de sodio (100 μM) o litio (100 μM) donde se midieron posteriormente los cambios del catión del medio líquido.

Al contrario de lo que se observó en el análisis del contenido de potasio del medio dónde la cepa silvestre y el mutante simple $\Delta trk1$ tomaron inmediatamente el potasio del medio mostrando un sistema de transporte eficaz (Capítulo 2), los resultados mostraron que en este caso, ninguna de las cuatro cepas disminuyó el contenido de sodio o litio del medio de manera notable, permaneciendo el contenido del mismo prácticamente invariable a lo largo del tiempo e indicando así la inexistencia de un sistema de transporte de alta afinidad por dichos cationes tóxicos. En las figuras también se representa la afinidad de la cepa silvestre por el potasio (Capítulo 2), con el fin de poder comparar los resultados obtenidos. Se observa cómo una misma cepa tiene afinidades distintas, alta (K^+) o baja (Na^+ o Li^+), dependiendo del catión estudiado (Figura 26).

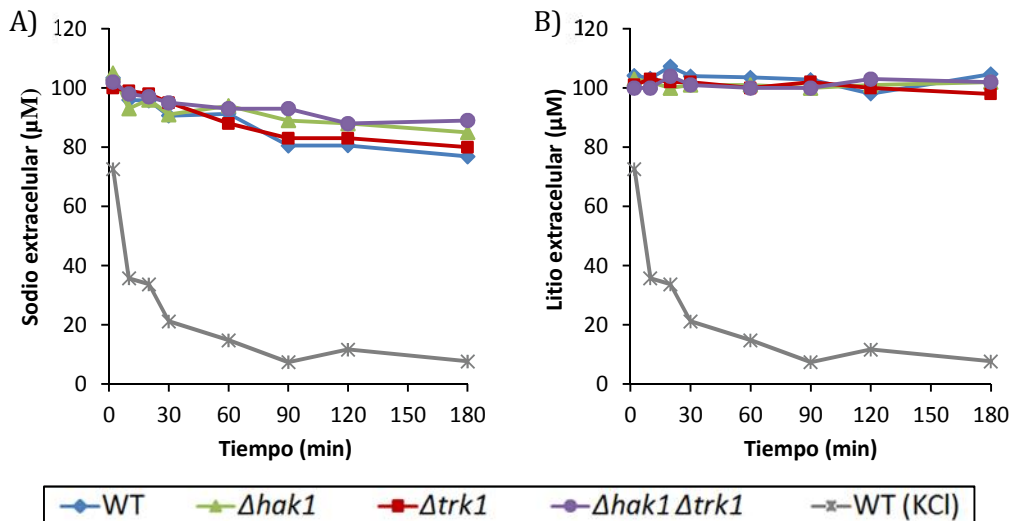


Figura 26. Variación de sodio y litio externo en las cepas de *Hansenula polymorpha*. Las células crecieron con KCl 50 mM y ayunadas de K^+ posteriormente (2 horas). A tiempo cero se resuspendieron con una $A_{600\text{nm}}$ de 0,7 en un medio con 100 μM de sodio (A) o litio (B). La línea gris indica la evolución del potasio de la cepa silvestre (tomado de la Figura 19.B, del Capítulo 2) utilizada como medida de control. En la figura se muestran dos ensayos representativos independientes.

4. Estudio de los flujos de entrada de litio (sodio)

El siguiente objetivo fue determinar el efecto de la mutación en *HAK1* y *TRK1* sobre los flujos de sodio al interior celular. Por las razones indicadas al inicio de este capítulo, se utilizó litio como un análogo del transporte de sodio para poder calcular más adecuadamente la velocidad de entrada del catión.

En un primer paso se estudió la entrada de litio a la célula mediante su adición al medio de cultivo. El ensayo se llevó a cabo en células crecidas en medio YPD. A tiempo cero, se añadió la cantidad de 100 mM de LiCl al medio y se tomaron muestras de la entrada del catión durante un tiempo determinado (30 minutos). Las medidas se llevaron a cabo mediante espectrofotometría de absorción atómica (ver Materiales y Métodos).

Los resultados mostraron que la entrada de litio en células normales fue similar entre las cepas, destacando el hecho de que el transporte de litio en el mutante simple $\Delta trk1$ fue ligeramente más rápido y acumuló más catión al final del ensayo respecto al resto de cepas (Figura 27).

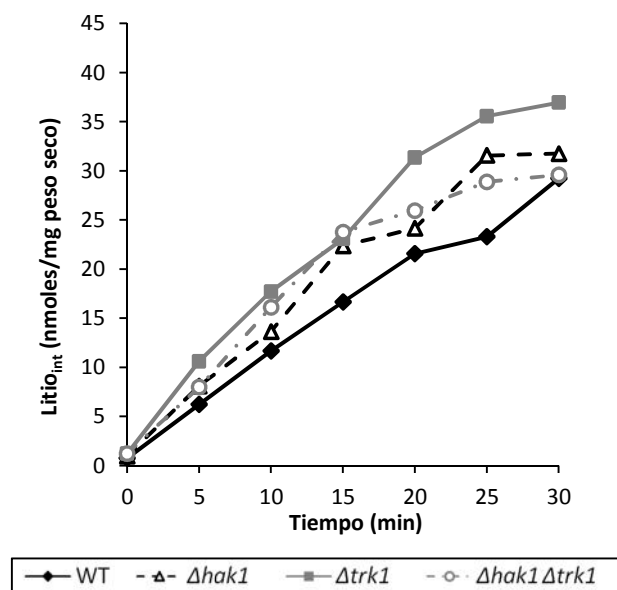


Figura 27. Entrada de Li^+ en las cepas. Las células crecieron en YPD a 37 °C. A tiempo cero se añadió LiCl 100 mM. Se tomaron distintas muestras que fueron analizadas por espectrofotometría de absorción atómica, los resultados obtenidos se midieron en nmoles del catión por mg de peso seco de células. En la figura se muestra un experimento representativo.

Con el fin de profundizar en el estudio del transporte de litio en la levadura *H. polymorpha* se realizó un segundo experimento de análisis de flujo de entrada del catión en las cepas. En esta ocasión, las cepas crecieron en medio YPD suplementado con 0,5 M de NaCl. Al igual que en el anterior ensayo, a tiempo cero se añadió la cantidad de 100 mM de LiCl al medio y se tomaron muestras de la entrada del catión durante un tiempo determinado (40 minutos). Asimismo, en esta ocasión, también se estudió el contenido interno de potasio, y sodio presentes al inicio y final del ensayo con el fin de ver la variación de la acumulación interna de dichos cationes en las células. Los resultados mostraron que, en el caso del transporte de litio por parte de células crecidas en presencia de sodio, el flujo de entrada de litio en la cepa $\Delta trk1$ fue más rápido y en mayor cantidad a lo largo del tiempo (Figura 28). Además, observamos que, al crecer, la acumulación del catión sodio, por parte de la cepa $\Delta trk1$, fue la más elevada, tanto al inicio como al final del ensayo, mientras que la acumulación de potasio por parte de dicha cepa fue la más baja respecto al resto (Figura 29). En definitiva, en células crecidas con sodio y en las que se analizó la entrada de su análogo (litio), el mutante $\Delta trk1$ acumuló mayores cantidades de los cationes tóxicos a la vez que menos potasio.

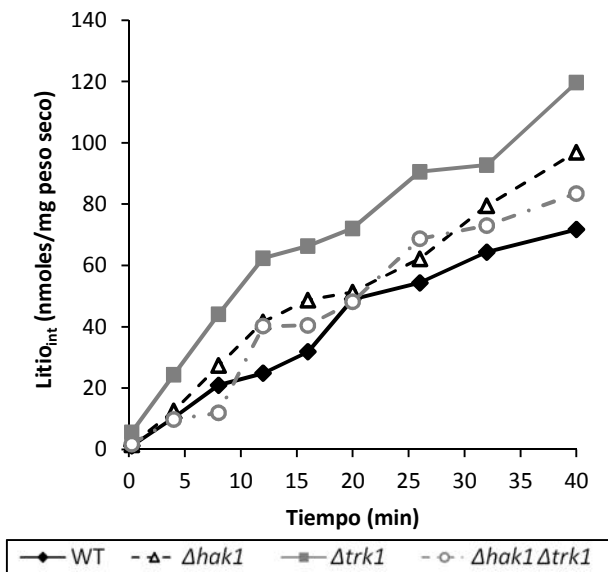


Figura 28. Entrada de Li^+ en las cepas crecidas en presencia de sodio. Las células crecieron en YPD suplementado con 0,5 M de NaCl a 37 °C. A tiempo cero se añadió LiCl 100 mM. Se tomaron distintas muestras que fueron analizadas por espectrofotometría de absorción atómica, los resultados obtenidos se expresaron en nmoles del catión por mg de peso seco de células. En la figura se muestra un experimento representativo.

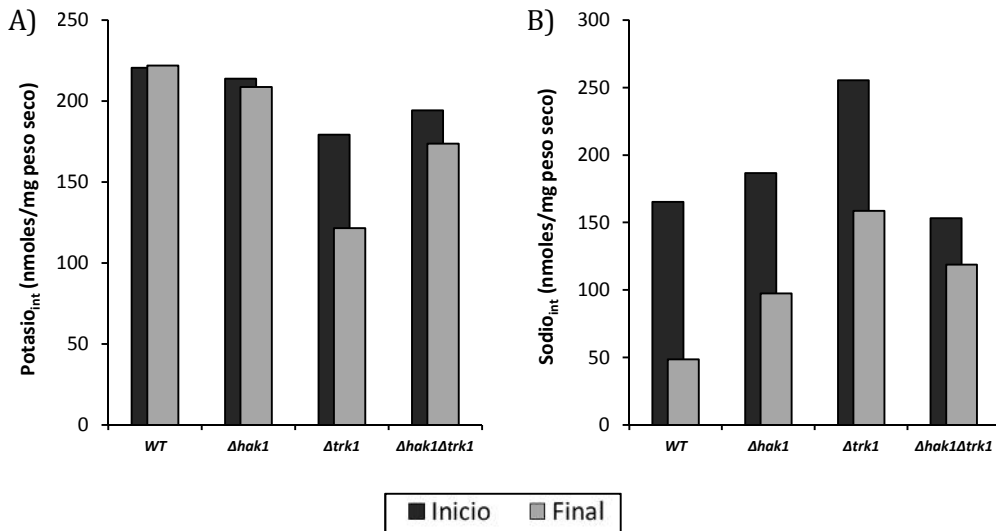


Figura 29. Contenido de potasio y sodio intracelular de las cepas. Las células crecieron en medio líquido YPD suplementado con 0,5 M de NaCl. A tiempo cero se le añadió 100 mM de LiCl. Se tomaron muestras, a tiempo 0 y a 40 minutos (coincidiendo con el inicio y final del ensayo de transporte), que fueron analizadas por espectrofotometría de absorción atómica. Los resultados obtenidos se midieron en nmoles del catión por mg de peso seco de células. En la figura se muestran los datos obtenidos de potasio (A) y sodio (B) del experimento de la Figura 28.

5. Expresión de los genes en presencia de sodio

Con el objetivo de estudiar el efecto de la presencia de sodio en la expresión de los genes *HAK1* y *TRK1*, analizamos mediante qRT-PCR la expresión de los mismos ante diferentes condiciones de presencia de sodio.

De forma complementaria a los ensayos de qRT-PCR realizados en el capítulo 2, se llevó a cabo un experimento adicional consistente en la adición de 50 mM de NaCl al comienzo de la fase de ayuno de potasio. Para ello, las células crecidas en medio YNB-F sin limitaciones de potasio fueron ayunadas de KCl en un medio YNB-F en presencia de sodio (50 mM NaCl). La sustitución del potasio por sodio durante el ayuno provocó una expresión de *HAK1* similar a la obtenida en la condición de ayuno de potasio sin NaCl, lo que parece indicar que sólo la presencia de potasio, y no la de sodio, mantiene bajos los niveles de expresión de *HAK1* en *H. polymorpha* (Figura 30).

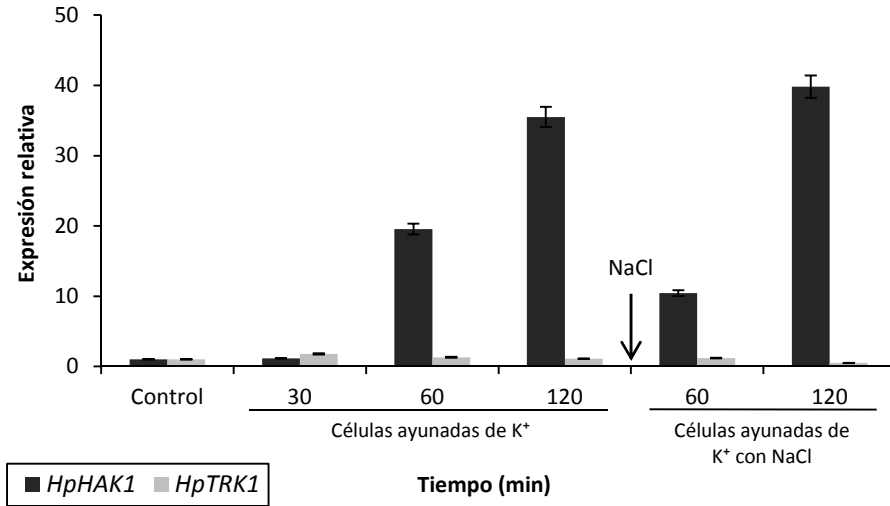


Figura 30. Expresión relativa de *HpHAK1* y *HpTRK1* en diferentes condiciones. Las células de *H. polymorpha* se cultivaron en medio YNB-F con KCl 50 mM (control) y posteriormente fueron sometidas a distintas condiciones y tiempos de ayuno de potasio que se indican en la parte inferior del eje horizontal (con/sin NaCl añadido 50 mM). Se analizaron los niveles de expresión mediante qRT-PCR en muestras recogidas a los tiempos indicados durante 2 horas. Las barras de error corresponden a las desviaciones típicas calculadas a partir de 3 repeticiones biológicas independientes.

Con el fin de obtener más información acerca del posible efecto regulador del sodio sobre la expresión de *HAK1*, se estudió de forma adicional el efecto de dicho catión sobre células previamente ayunadas de potasio. Para ello, a las células de levaduras sometidas a tratamiento de ayuno de potasio durante dos horas se añadió 50 mM de NaCl, momento en el que los niveles de expresión alcanzaron su nivel más elevado.

Los resultados mostraron que mientras que la sobreexpresión de *HAK1* se redujo totalmente cuando se le añadió potasio (50 mM KCl) (ver Capítulo 2), en este caso, el efecto del sodio no fue tan elevado y la disminución de la expresión de *HAK1* fue menor, cayendo los niveles de sobreexpresión de 35 a 25 veces tras dos horas de incubación (Figura 31).

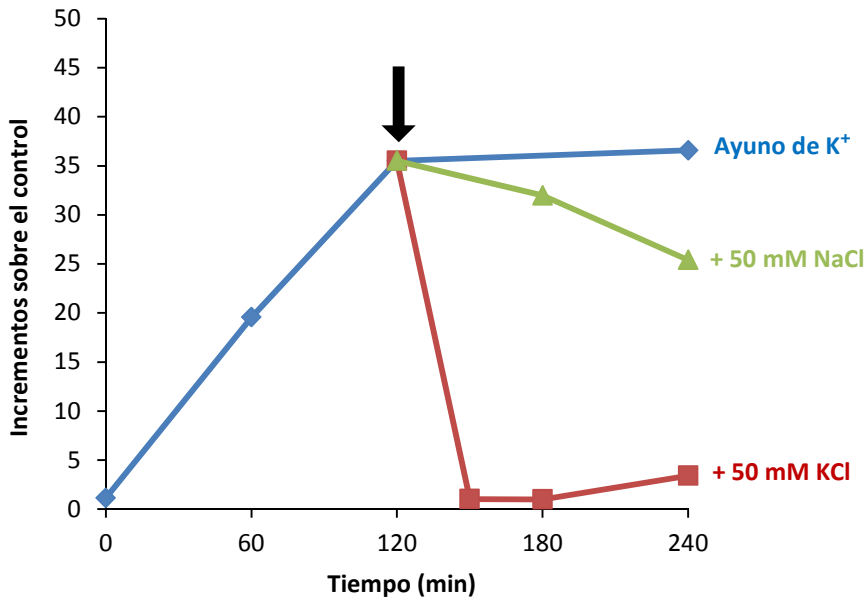


Figura 31. Evolución de los niveles de transcritos de *HpHAK1* a lo largo del tiempo. Las células se cultivaron en medio YNB-F líquido sin limitaciones de potasio y posteriormente se incubaron en ayuno de potasio, tomando muestras a lo largo del tiempo (línea azul). A las dos horas de ayuno (indicado por la flecha), se añadió a los cultivos 50 mM de KCl (línea roja) o 50 mM de NaCl (línea verde) y se analizaron los niveles de transcritos en muestras recogidas a los tiempos indicados hasta las 4 horas.

De forma adicional, se estudió la expresión de *HAK1* y *TRK1* en las distintas cepas de *H. polymorpha* ($\Delta hak1$ y $\Delta trk1$) cuando estas crecieron en presencia de sodio (0,5 M). De nuevo, una vez más, encontramos que la expresión de *TRK1* no se vio significativamente alterada, en este caso por la presencia de sodio en el medio. Por otro lado, los resultados obtenidos mostraron que, el gen *HAK1* se sobreexpresó más de 6 veces en presencia de sodio en comparación con la expresión del mismo gen en la cepa silvestre en la misma condición. En definitiva, la ausencia de *TRK1* en la levadura eleva los niveles transcripcionales de *HAK1* tanto en las diferentes condiciones de potasio (Capítulo 2) como en presencia de sodio (Figura 32).

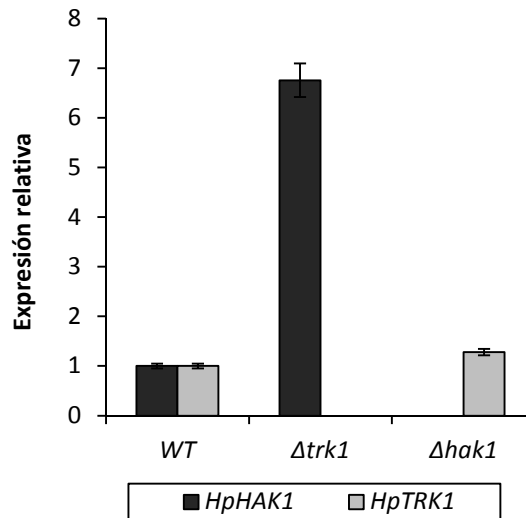


Figura 32. Expresión relativa de *HAK1* y *TRK1* en presencia de NaCl de la cepa silvestre y los mutantes $\Delta hak1$ y $\Delta trk1$. Las células de *H. polymorpha* se cultivaron en medio YNB-F con 50 mM suplementado con 0,5 M de NaCl y se determinó el nivel de expresión de *HAK1* y *TRK1* por qRT-PCR. Las barras de error corresponden a las desviaciones típicas calculadas a partir de 3 repeticiones biológicas independientes.

6. Estudio del papel de la calcineurina

Llegados a este punto, y teniendo en cuenta los resultados obtenidos en los que la cepa $\Delta trk1$ muestra unas características claramente distintas al resto de las cepas en presencia de sales, nuestro siguiente objetivo fue obtener más información sobre la regulación del papel que tienen los transportadores Hak1 y/o Trk1 en la homeostasis de sales tóxicas (sodio o litio). Los resultados presentados hasta aquí son compatibles con un papel de Hak1 en la entrada de sodio. El mutante $\Delta trk1$ mostraría una mayor expresión de *HAK1* y eso estaría relacionado con su sensibilidad. Durante la realización de esta Tesis, el grupo del Dr. Siverio ha demostrado que la calcineurina tiene un papel regulador sobre la expresión de *HAK1* en la levadura *H. polymorpha* (Dr. Elisa Cabrera, Tesis Doctoral, 2011). Por todo ello, se utilizaron y estudiaron cepas mutantes en el gen de la calcineurina y/o el gen *TRK1*. Cabe señalar que estas cepas disponen del promotor *pHAK1-lacZ*, ya que están siendo utilizadas de forma paralela para realizar una serie de análisis aún por desarrollar.

6.1. Crecimiento en medio sólido

Se estudió el efecto de las sales, litio y sodio, sobre el crecimiento de las cepas construidas con *pHAK1-lacZ*. Para ello se realizaron test de goteo en medio sólido YPD suplementado con litio o sodio. Tal y como se puede observar en la Figura 33, en YPD todas las cepas tienen un buen crecimiento, sin embargo, cuando se suplementó el medio con sales se observó que, mientras las cepas silvestre y $\Delta cnb1$ tuvieron un crecimiento normal, la cepa $\Delta trk1$ presentó una alta sensibilidad mostrando un crecimiento más pobre. Esta sensibilidad desapareció en el doble mutante $\Delta trk1\Delta cnb1$.

Por un lado, mediante este experimento se apoyó la idea de que Hak1 no sólo funciona como transportador de potasio en *H. polymorpha* sino que tiene un papel fundamental en el transporte de sales, ya que vimos como la cepa $\Delta trk1\Delta cnb1$ (en la que *HAK1* está reprimido por la interrupción de *CNB1*) recupera el fenotipo de la cepa silvestre en presencia de sales, al igual que sucedía con la cepa $\Delta hak1\Delta trk1$ (Capítulo 3. Punto 1). Y por otro lado, se confirmó que de alguna forma el transportador Trk1 actúa como regulador de Hak1, ya que la cepa $\Delta trk1$ es la única que muestra un fenotipo de alta sensibilidad a sal, sin embargo cuando el transportador Trk1 está presente (cepa silvestre) el fenotipo no se observa (Figura 33).

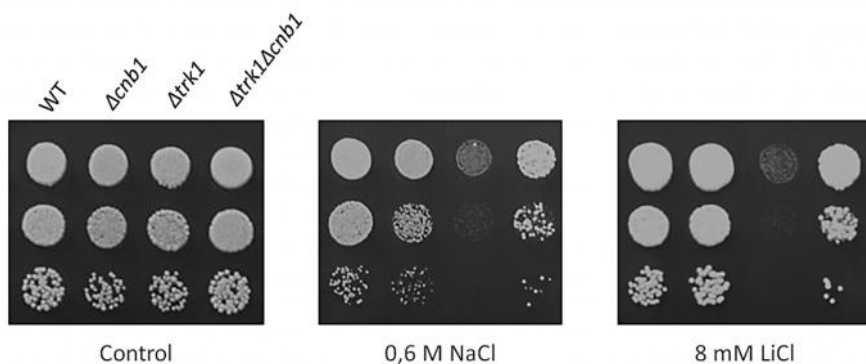


Figura 33. Efecto del sodio/litio en el crecimiento de las cepas de *H. polymorpha* con la construcción *pHAK1-lacZ*. Ensayo realizado mediante test de goteo en medio YPD suplementado con NaCl o LiCl, en el que se sembraron diluciones seriadas de cada cepa partiendo de una suspensión celular ($A_{600nm}=0,1$). Las placas se incubaron a 37 °C durante 48-72 horas.

6.2. Contenido interno de cationes

De forma complementaria, se estudió el contenido interno de los cationes sodio, litio y potasio cuando las cepas (con la construcción *pHAK1-lacZ*) fueron crecidas en diferentes condiciones de cultivo, con el fin de confirmar si la sensibilidad de la cepa *Δtrk1* en medio sólido en presencia de sales podría deberse a una acumulación mayor de cationes. Para ello las cepas crecieron en medio YPD en presencia de litio (5 mM LiCl) o sodio (0,5 M NaCl).

Los resultados obtenidos mostraron que en ambas condiciones, las cepas tienen un contenido de potasio similar, a excepción de la cepa *Δtrk1*, la cual en presencia de sodio (0,5 M) acumuló aproximadamente un 25% menos de potasio que el resto de las cepas. Con respecto al contenido de cationes tóxicos (sodio o litio), resalta el hecho de que en ambas condiciones la cepa *Δtrk1* acumuló mayor cantidad respecto a las restantes cepas, confirmando así que la mayor acumulación de cationes tóxicos debe estar directamente relacionada con la sensibilidad observada (Figura 34).

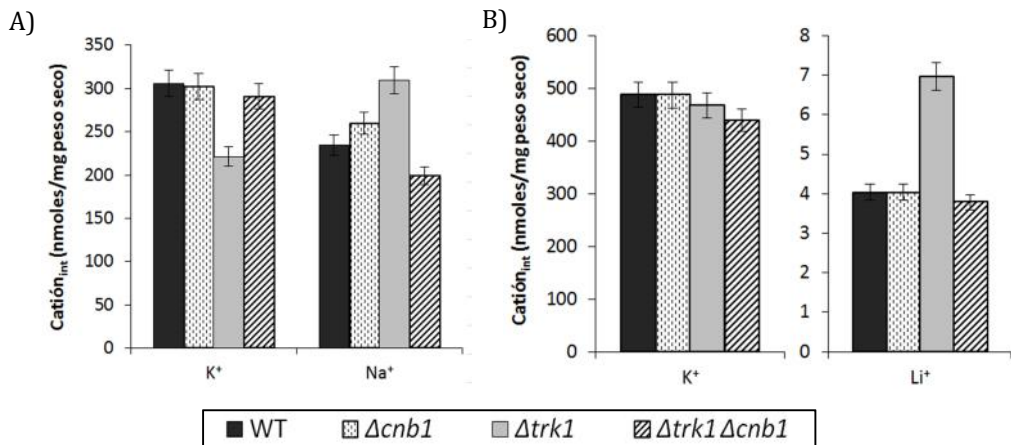


Figura 34. Contenido de sodio, litio y potasio intracelular de las cepas construidas con *pHAK1-lacZ*. Las células crecieron en medio líquido YPD suplementado con 0,5 M de sodio (A) o 5 mM de litio (B). Las barras de error corresponden a las desviaciones típicas calculadas a partir de 3 repeticiones biológicas independientes.

CAPÍTULO 4

**OTROS ASPECTOS EN LA CARACTERIZACIÓN
DE *HANSENULA POLYMORPHA***

En este último capítulo se muestran los resultados obtenidos tras el estudio de diferentes aspectos para la caracterización de la levadura *Hansenula polymorpha*, complementarios con los distintos estudios relativos a la homeostasis de cationes descritos anteriormente.

Los ensayos se realizaron tanto en medio YPD como en medio YNB e YNB-Formedium, y los resultados obtenidos fueron cualitativamente iguales en todos los medios empleados. A lo largo de este capítulo se muestran los resultados obtenidos a partir de ensayos realizados en los diferentes medios.

1. Crecimiento en presencia de distintas drogas catiónicas

Mediante test de goteo en medio sólido se estudió el efecto de distintas drogas catiónicas sobre el crecimiento de la cepa silvestre de *H. polymorpha* y de las cepas carentes de los sistemas de transporte de potasio ($\Delta hak1$, $\Delta trk1$ y $\Delta hak1\Delta trk1$). La sensibilidad a drogas catiónicas se suele utilizar en *S. cerevisiae* como índice indirecto de la hiperpolarización del potencial de membrana.

El resultado de este ensayo fue que el uso de estas drogas en *H. polymorpha* no es tan útil como en la levadura modelo ya que los resultados no fueron uniformes (Figura 35). Cuando las cepas crecieron en presencia de higromicina B se observó un evidente crecimiento defectuoso de la cepa $\Delta trk1$ mientras que el resto de las cepas mostraron un crecimiento normal. No obstante, cuando las cepas crecieron en presencia de TMA este fenotipo no fue tan claro y fue más desapercibido. Por otro lado, en presencia de espermina no sólo la cepa $\Delta trk1$ mostró un crecimiento menor sino también la cepa $\Delta hak1$ mostró un fenotipo sensible a esta droga, aunque sorprendentemente el mutante doble $\Delta hak1\Delta trk1$ tuvo un crecimiento normal y similar al de la cepa silvestre.

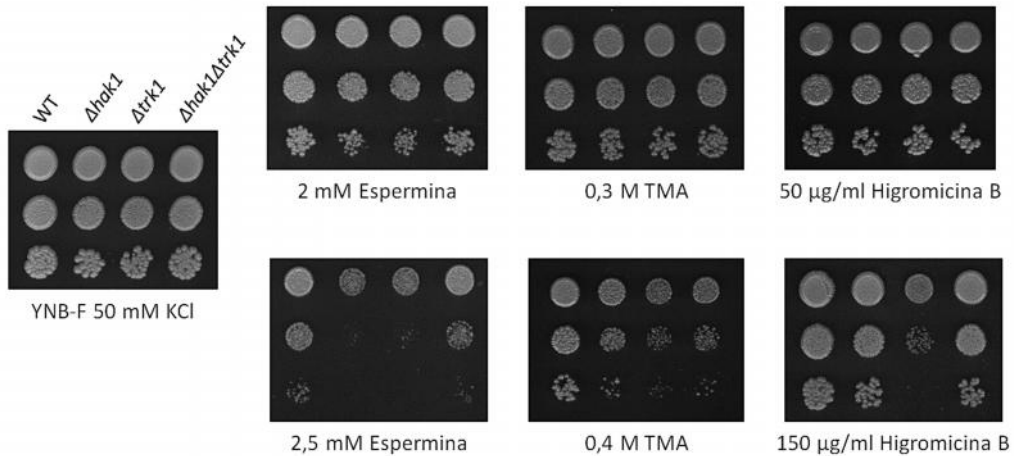


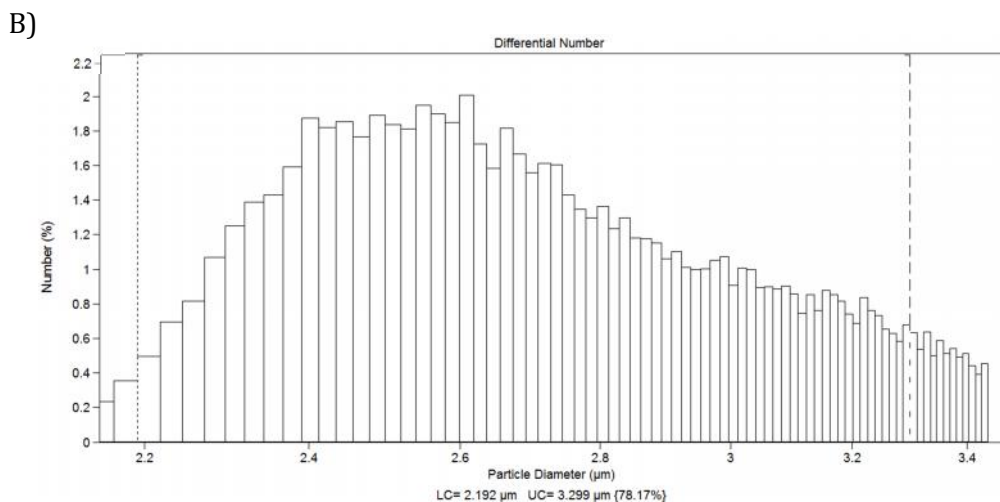
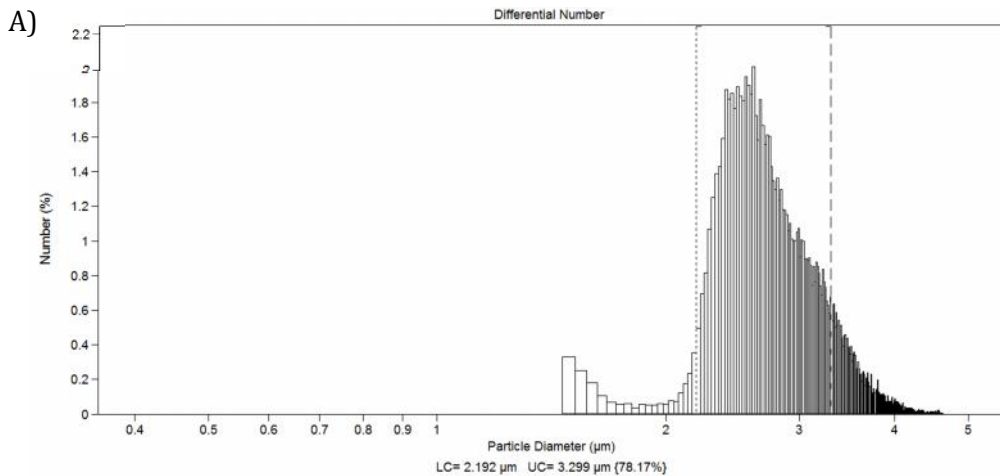
Figura 35. Efecto de los compuestos espermina, TMA e higromicina B sobre el crecimiento de las cepas de *Hansenula polymorpha*. Las células crecieron en medio sólido YNB-F con 50 mM de KCl y suplementado con distintas concentraciones de espermina, TMA o higromicina B. En esta figura se muestra el crecimiento de gotas correspondientes a tres inóculos (1:1, 1:10, 1:100) obtenidos a partir de una suspensión de células ($A_{600nm}=0,1$). Las placas se incubaron a 37 °C durante 48-72 horas.

2. Determinación del volumen celular

Como se demostró en el capítulo 2 y 3 del apartado de Resultados, existe una diferencia en la acumulación de potasio y sodio por parte de las diferentes cepas de *Hansenula polymorpha* estudiadas en la homeostasis de potasio y sodio. El tamaño celular podría verse afectado por esta diferencia de cationes internos, por este motivo decidimos estudiar los posibles cambios en el volumen celular de la cepa silvestre y las cepas carentes de los sistemas de transporte de potasio de *H. polymorpha*.

Se estudió el volumen de células crecidas en condición control (50 mM KCl) y sometidas a tratamiento de ayuno de potasio durante 2 horas. El volumen celular se determinó mediante el uso de un Cell Counter Z2 (Beckman-Coulter) y los valores obtenidos se expresaron en femtolitros (fL) (ver Materiales y Métodos).

La Figura 36 es un ejemplo representativo de cómo se obtienen los valores a partir del software específico incorporado al equipo. En la gráfica resultante dada por el software vienen representados todos los datos obtenidos de la población de células mediante una curva con forma de campana. Debido a la gran variedad de datos obtenidos a lo largo de la curva de la gráfica, acotamos la misma mediante un intervalo de datos que incluya los valores representativos de la población, es decir que recoja más del 75% de los datos poblacionales, sobre el que el propio software realizará una estadística de conteo. Los datos dados por el equipo pueden obtenerse tanto en micras de diámetro como en femtolitros (fL), Asumiendo que la levadura es esférica estudiamos el volumen en fL.



C)

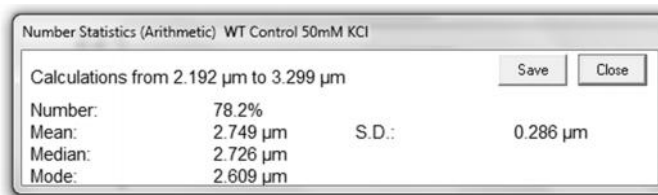


Figura 36. Ejemplo de cómo se obtienen los resultados del volumen celular a partir del software específico COULTER AccuComp 3.01 de Beckman-Coulter. En la figura se muestra: gráfica general que representa el tamaño en μm de todas las partículas medidas (A); selección de un intervalo de valores lógico y representativo dentro de nuestro estudio (B); obtención de los parámetros estadísticos de ese intervalo representativo (C).

En la Figura 37 se muestran los resultados finales del estudio. Una acumulación mayor de cationes podría relacionarse con un mayor volumen celular, pero nuestro estudio reveló que las cepas silvestre y $\Delta trk1$ que acumulan ligeramente más contenido potásico en condición control (ver Capítulo 2), mostraron un volumen menor respecto a las otras cepas en las condiciones estudiadas. Sin embargo, en la condición de ayuno sí que observamos una relación entre la acumulación de potasio y el volumen, siendo las cepas $\Delta hak1$ y $\Delta hak1\Delta trk1$, que presentan un mayor contenido de potasio en esta condición (ver Capítulo 2), las que presentaron un volumen mayor.

Los datos se estudiaron con el programa estadístico SPSS y se representaron mediante un diagrama de caja (Box-plot), en el cual la caja central indica el rango en el que se concentra el 50 % de los datos y sus extremos son el primer y tercer cuartil de la distribución. La línea central de la caja es la mediana (si la variable es simétrica, dicha línea se encontrará en el centro de la caja), y los extremos de los “bigotes” que salen de la caja son los valores que delimitan el 95 % central de los datos, que en ocasiones, coinciden con los valores extremos de la distribución.

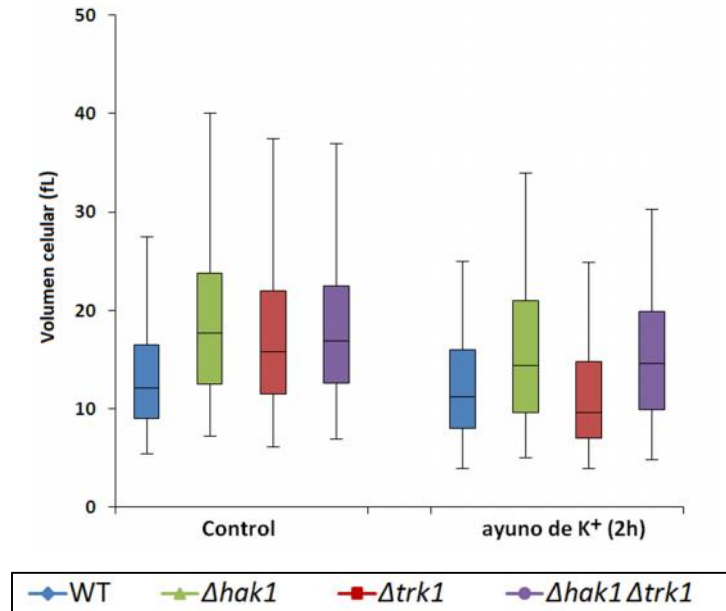


Figura 37. Medida del volumen celular en las cepas de *H. polymorpha* en condición control y en ayuno de potasio. Las células crecieron con 50 mM KCl (control), o con 50 mM KCl y posteriormente ayunadas de potasio durante 2 horas. Los resultados obtenidos fueron tratados por el programa estadístico SPSS, y representados mediante diagrama de caja.

De forma adicional, también se estudió el volumen celular de las cepas crecidas en presencia de sodio (0,5 M NaCl). En este caso, y teniendo en cuenta como referencia los volúmenes de las cepas en condición control, cabe concluir que las medidas disminuyeron en todos los casos y que el doble mutante $\Delta hak1 \Delta trk1$ mantuvo un mayor volumen respecto a las otras cepas (Figura 38). Cabe destacar que la cepa la cepa $\Delta trk1$, que acumula mayores cantidades de sodio en estas condiciones (ver Capítulo 3), no mostró un volumen significativamente diferente respecto al resto de cepas.

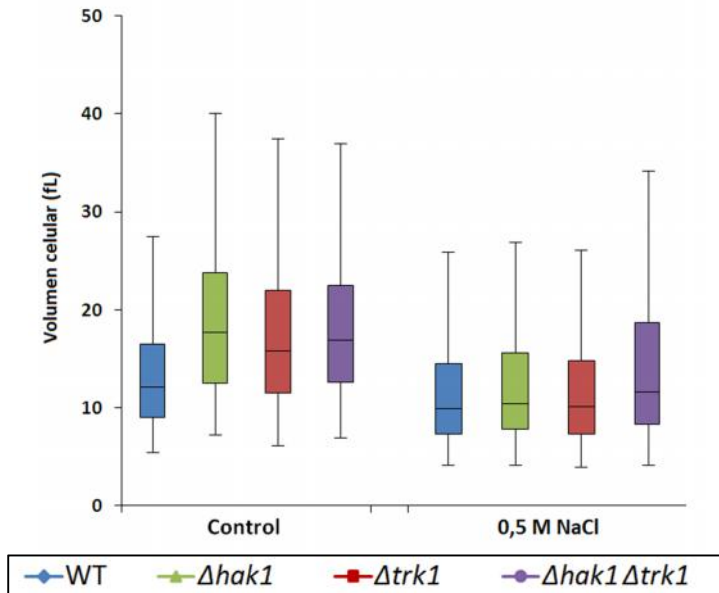


Figura 38. Medida del volumen celular en las cepas de *H. polymorpha* en condición control y en presencia de sodio. Las células crecieron en condición control (50 mM KCl) o en YNB-F con 50 mM KCl suplementado con 0,5 M de NaCl. Los resultados obtenidos fueron tratados por el programa estadístico SPSS, y representados mediante diagrama de caja.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos, podemos decir que en las condiciones estudiadas la acumulación catiónica no está relacionada directamente con el volumen celular en el caso de la levadura *H. polymorpha*, o al menos no es el único factor a considerar.

3. Análisis del potencial relativo de membrana

En trabajos previos realizados con la levadura modelo *S. cerevisiae* (Madrid *et al.*, 1998; Navarrete *et al.*, 2010) se ha demostrado que las cepas carentes de los sistemas de transporte de potasio presentan un potencial de membrana más elevado respecto a la cepa control (silvestre) y que el tratamiento a concentraciones bajas o limitadas de potasio provoca una hiperpolarización del potencial relativo de membrana, siendo éste mayor en aquellas cepas que carecen

de alguno de los transportadores de potasio. Con el fin de verificar si esta condición se da en *H. polymorpha* se midió el potencial relativo de membrana en la cepa silvestre y en las cepas carentes de los transportadores Hak1 y/o Trk1, a distintas condiciones de crecimiento y ayuno.

Para llevar a cabo estos experimentos, se trataron las células de *H. polymorpha* con amiodarona (AMD) para comprobar su efecto sobre el potencial relativo de membrana. La AMD es un bloqueador de los canales iónicos de uso clínico como antiarrítmico, que puede tener amplios efectos antifúngicos y que desencadena hiperpolarización de la membrana. En la Figura 39 vemos como la adición de AMD a la muestra provocó una hiperpolarización del potencial de membrana. De esta forma, comprobamos que la metodología para medir el potencial relativo de membrana en *S. cerevisiae* (Marešová *et al.*, 2009) funcionaba correctamente en la levadura *H. polymorpha*.

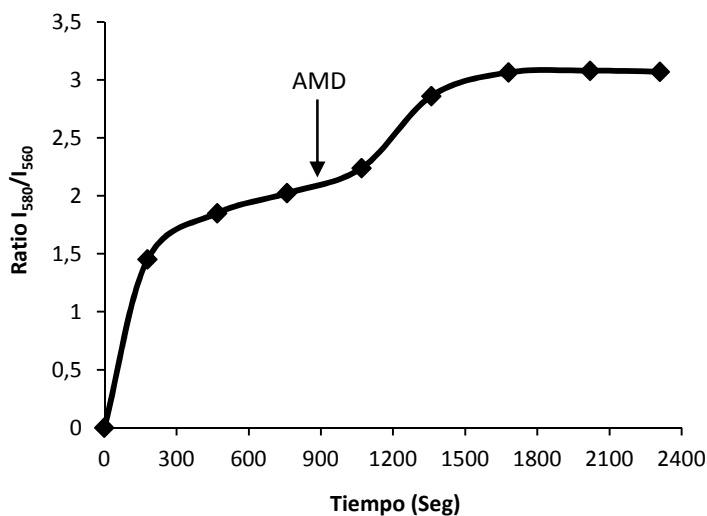


Figura 39. Efecto de la amiodarona sobre el potencial relativo de membrana. Células crecidas con 50 mM KCl se recogieron y resuspendieron en un tampón MES-TEA y se midió el ratio de emisión de fluorescencia (I_{580}/I_{560}) tras la adición del fluoróforo diS-C₃(3). Al tiempo indicado por la flecha, se añadió a la muestra 0,1 mM de amiodarona (AMD). En la figura se muestra un experimento representativo.

Estudiamos el potencial relativo de membrana en células crecidas en condición normal (YNB-F con 50 mM KCl), y en células sometidas a diferentes tiempos de ayuno de potasio. Los resultados mostraron que al contrario de lo que ocurre en la levadura modelo *S. cerevisiae*, donde las cepas mutantes en los transportadores de potasio presentan hiperpolarización respecto a la silvestre, en la levadura *H. polymorpha* las cepas que carecen de alguno de los sistemas de transporte de potasio muestran una cierta despolarización en condición control. De igual forma es sorprendente que en estados de ayuno todas las cepas estudiadas no presenten una hiperpolarización respecto a la condición control sino que, al someterlas a tratamiento de ayuno de potasio, su potencial relativo de membrana va disminuyendo y esta despolarización es mayor conforme más tiempo se vean sometidas a estado de ayuno. Por otro lado cabe señalar que, la despolarización del potencial de membrana fue mayor en las cepas $\Delta hak1$ y $\Delta hak1\Delta trk1$, las cuales disminuyeron de forma drástica su potencial respecto a la condición control y al resto de cepas. En el caso de la cepa silvestre y la cepa $\Delta trk1$ la disminución del potencial fue menor y sorprendentemente la cepa $\Delta trk1$ fue la que mostró unos valores más cercanos a los de la cepa silvestre (Figura 40).

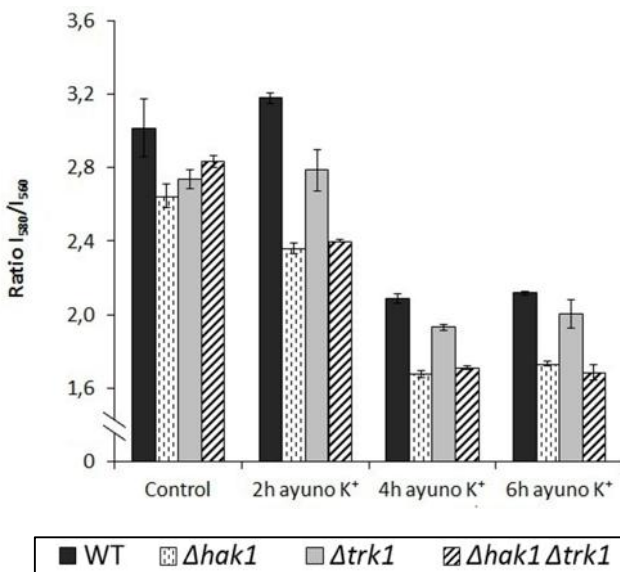


Figura 40. Potencial relativo de membrana de *H. polymorpha* en células normales y células ayunadas de potasio. Las células crecieron en medio control (50 mM KCl) y posteriormente fueron ayunadas de potasio durante diferentes tiempos. Se midió el ratio de emisión de fluorescencia I_{580}/I_{560} de la sonda diS-C₃(3). Las barras de error representan las desviaciones típicas de tres experimentos independientes.

De igual manera, se estudió también el potencial relativo de membrana en las cepas cuando fueron sometidas a presencia de sodio. Las cepas crecieron en YNB-F con 50 mM de KCl y 0,5 M de sodio. Los resultados obtenidos se compararon con los datos de la condición control. Al igual que ocurrió con las cepas ayunadas, el potencial relativo de membrana presentó una disminución, una despolarización, en todas las cepas. Cabe destacar que, en este caso, todas las cepas mutantes presentaron un potencial relativo de membrana similar y, una vez más, menor al de la cepa silvestre (Figura 41).

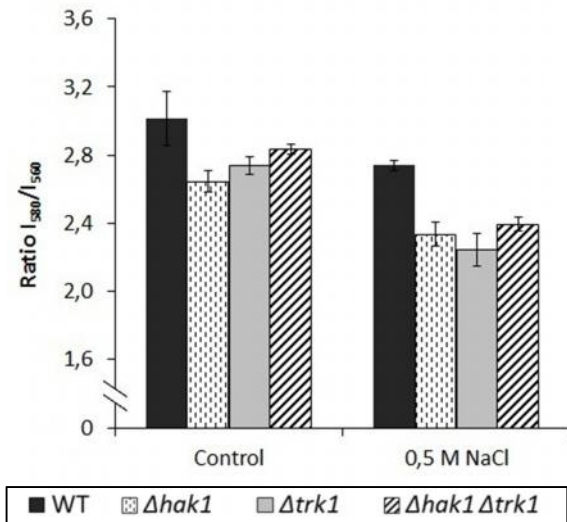


Figura 41. Potencial relativo de membrana en cepas de *H. polymorpha* crecidas en condición normal y en presencia de sodio. Las células crecieron en YNB-F con 50 mM de KCl (control) y en YNB-F con 50 mM de KCl y 0,5 M de NaCl. Posteriormente se midió el ratio de emisión de fluorescencia I_{580}/I_{560} de la sonda diS-C₃(3). Las barras de error representan las desviaciones típicas de tres experimentos independientes.

4. Efecto de la glucosa en la variación del pH extracelular

Sabiendo que la monitorización de la acidificación del medio sirve para: estudiar la inducción de la ATPasa Pma1 por glucosa en el caso de la levadura *S. cerevisiae*; comparar los efectos de diferentes mutaciones en el índice de acidificación; investigar la fuerza del promotor que regula la expresión de la bomba de protones; o para poner a prueba el efecto de los inhibidores de la bomba de protones, decidimos estudiar la variación del pH extracelular de las cepas de

H. polymorpha. Para ello las células crecieron en YNB-F con 50 mM de KCl. Las cepas fueron ayunadas de glucosa durante una hora en el mismo medio y, posteriormente se añadió glucosa a una concentración final de 2%. El proceso fue monitorizado en todo momento mediante un lector de microplacas (Ver Materiales y Métodos).

Los resultados mostraron que durante el proceso de ayuno de glucosa, el pH del medio se mantuvo estable. Tras una hora en ausencia de glucosa, la adición de ésta originó una disminución del pH, provocando una acidificación del medio. Se observó que las cepas mutantes en los sistemas de transporte de potasio presentaron una disminución del pH del medio más rápida y mayor que la cepa silvestre, la cual presentó una acidificación más lenta y con valores más bajos a lo largo del tiempo (Figura 42).

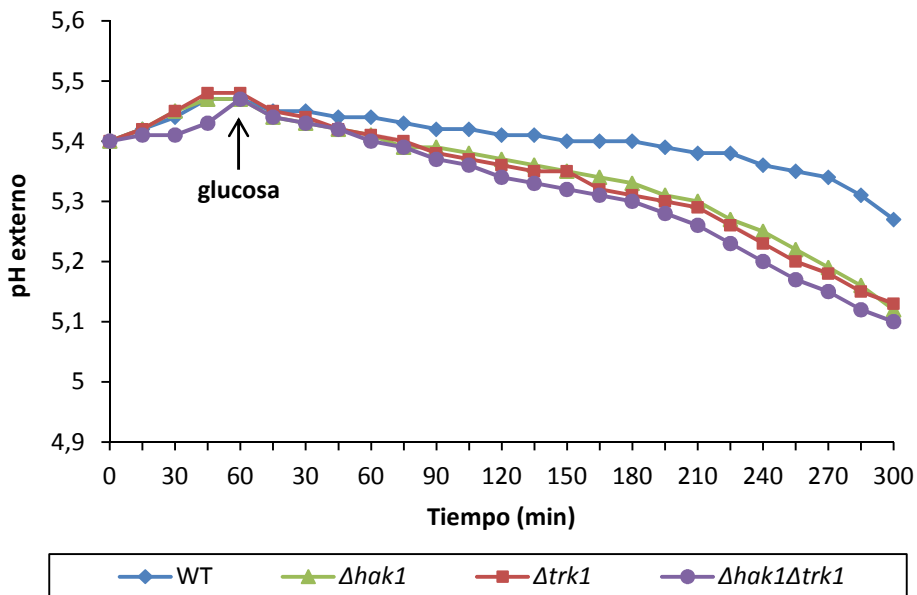


Figura 42. Comparación de la acidificación del medio por las cepas de *Hansenula polymorpha*. Las células crecieron sin restricciones de potasio (50 mM KCl) y posteriormente fueron ayunadas de glucosa en el mismo medio durante 60 minutos. La acidificación del medio fue iniciada por la adición de glucosa a una concentración final de 2%. La acidificación del medio se estudió a partir de los cambios de absorbancia de las muestras medidos con un lector de microplacas. En la figura se muestra un experimento representativo.

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

DISCUSIÓN

Hansenula polymorpha es una levadura “no convencional” de gran interés y potencial utilidad en procesos biotecnológicos. Se trata de una levadura metilotrófica y termotolerante, capaz de crecer a más de 50 °C. *H. polymorpha* es una levadura de interés ya que es considerada como una de las levaduras no convencionales más importantes tanto a nivel industrial, por ejemplo en la producción de proteínas recombinantes o la obtención de vacunas para la hepatitis B; como en investigación, en el estudio del metabolismo de metanol, la asimilación de nitratos, etc.

Hasta el momento de la realización de este trabajo ha sido muy escasa la información publicada sobre la homeostasis de potasio y sodio en *H. polymorpha*. Gracias a una investigación previa llevada a cabo en el laboratorio del Dr. J.M. Siverio (ULL), sabemos que la proteína Ure2 contribuye a la tolerancia de Na⁺/Li⁺ de *H. polymorpha* regulando positivamente la expresión de *ENA1*, además de participar en la represión catabólica del nitrógeno (Rodríguez *et al.*, 2010).

La mayoría de las levaduras poseen dos sistemas de transporte de potasio en la membrana plasmática (Hak y/o Trk), como *S. cerevisiae* y *S. pombe* que cuentan con dos transportadores pertenecientes a la familia Trk (Tr1 y Trk2) o *D. hansenii* y *D. occidentalis* que poseen un transportador de cada uno de los tipos (Hak1 y Trk1). No obstante, existen excepciones y algunas levaduras como *Z. rouxii* o *C. glabrata*, entre otras, sólo parecen poseer un transportador de potasio (Trk1) (Střibný *et al.*, 2012). El hecho de que la mayoría de levaduras posean más de un sistema transportador de potasio eficiente en la membrana plasmática, demuestra la importancia de la función del potasio para las levaduras. En un trabajo previo a esta tesis, el grupo del Dr. J.M. Siverio consiguió identificar en el genoma de *H. polymorpha* dos secuencias homólogas a los genes *HAK1* y *TRK1* que codifican sistemas de transporte de potasio en la levadura *D. occidentalis* (anteriormente denominada *Schwannyomyces occidentalis*). A lo largo de ese trabajo previo se realizó una primera comparación con otros genes homólogos y llegaron incluso a

preparar mutantes correspondientes a estos genes ($\Delta hak1$, $\Delta trk1$ y $\Delta hak1\Delta trk1$) (Martín 2008; Cabrera 2011; Tesis Doctoral).

Con estas premisas nos propusimos caracterizar la aportación de estos dos genes a la homeostasis de potasio y sodio en *H. polymorpha*, abordando el estudio desde una aproximación principalmente bioquímica y fisiológica.

En nuestro caso, a partir de las secuencias de los genes obtenidas gracias al grupo del Dr. Siverio, realizamos un análisis de BLAST, alineamientos y árboles filogenéticos de las proteínas codificadas que confirmaron que los genes *HAK* y *TRK* pertenecen a familias evolutivamente distanciadas y que mientras que *HpHak1* posee mayor similitud con las proteínas de las levaduras *D. hansenii* y *D. occidentalis*, *HpTrk1* es más similar a la proteína *Trk2* de *S. cerevisiae* y *Trk1* de *D. hansenii*.

Aportación a la homeostasis de potasio

Dos tipos de experimentos indican la importancia de *HAK1* en los flujos de potasio de *H. polymorpha*. Por una parte, los ensayos de crecimiento muestran un defecto de crecimiento a concentraciones bajas de potasio en los mutantes carentes del sistema de transporte *Hak1*. Por otra parte, los experimentos de transporte de rubidio (como análogo al potasio) refuerzan esta idea, ya que las constantes cinéticas del transporte se vieron muy afectadas en los mutantes $\Delta hak1$ y $\Delta hak1\Delta trk1$. La K_m de las cepas con el gen *HAK1* interrumpido fue 100 veces mayor (1,5 y 1,7 mM) y su V_{max} fue 3-4 veces menor que las de la cepa silvestre y *Atrk1*. De igual manera, estos mismos ensayos mostraron que, en las condiciones estudiadas, la aportación de *TRK1* a la homeostasis de potasio es muy limitada, ya que tanto el crecimiento como el transporte de rubidio se vieron muy poco afectados por la disrupción de este gen. De hecho, y en relación a la homeostasis de potasio, *TRK1* fue un gen totalmente dispensable en cualquiera de las condiciones estudiadas.

Con respecto a la expresión de estos genes en diversas condiciones analizadas, hemos demostrado que *HAK1* está sometido a una fuerte regulación transcripcional, se expresa más en condiciones de potasio limitado o en ausencia de éste, y su expresión se inhibe en presencia del catión, tal y como sucede, por ejemplo, en la levadura *D. occidentalis* (Bañuelos *et al.* 2000). Por otro lado hemos observado que la expresión de *TRK1* prácticamente no está regulada en las condiciones experimentales estudiadas en este trabajo. Esto coincide con la información que ya disponemos de otras levaduras como *D. occidentalis* (Bañuelos *et al.*, 2000) o *D. hansenii* (Prista *et al.*, 2007; Martínez *et al.*, 2011) donde no encontramos evidencia experimental de la regulación transcripcional de *TRK1* bajo condiciones de estrés relacionadas con los cationes o el ayuno de éstos, o con el caso de *N. crassa* en el que se ha demostrado recientemente la expresión constitutiva del gen (Rivetta *et al.*, 2013). Un resultado muy novedoso es que en ausencia de *TRK1*, la expresión de *HAK1* en *H. polymorpha* resulta incrementada en las condiciones de potasio estudiadas (50, 3 y 0,5 mM KCl), sugiriendo un cierto papel (directo o indirecto) de *TRK1* en la regulación de la expresión de *HAK1*.

En las levaduras, *S. cerevisiae* y *S. pombe*, en las que se ha estudiado el transporte en los mutantes que carecen de sus sistemas de transporte (*trk1trk2*), las características cinéticas y el crecimiento indican que tienen muy poca afinidad por el potasio, apenas crecen en concentraciones menores de 10 mM KCl y poseen además una cinética de muy baja afinidad, con una Km mayor de 20 mM (Navarrete *et al.*, 2010). Sin embargo, en nuestro caso, el doble mutante de *H. polymorpha* ($\Delta hak1\Delta trk1$) crece en concentraciones mucho menores de potasio (0,5 mM KCl), y muestra un crecimiento similar al de la cepa silvestre en presencia de cantidades de potasio superiores a 5 mM. Asimismo, cabe señalar que esta cepa tiene una cinética de mayor afinidad en condiciones de ayuno de potasio respecto a la levadura modelo, con una Km de 4,5 mM. A pesar de que en un primer análisis del genoma de *H. polymorpha* no se han encontrado indicios de la presencia de un transportador adicional a los dos descritos, los resultados obtenidos en este trabajo sugieren la posible existencia de una tercera proteína, diferente a *HpHak1*

y *HpTrk1*, implicada en el transporte con una cierta especificidad. La existencia de una especie de levadura que lleve tres transportadores en la membrana plasmática para la captación de K^+ no es una excepción, ya que se ha demostrado que las levaduras *Pichia stipitis* y *Pichia sorbitophila*, además de genes *HAK1* y *TRK1*, también llevan un gen perteneciente a la familia de las ATPasas Acu (Alkali Cation Uptake), que median la absorción de K^+ y Na^+ (Benito *et al.*, 2004; Arino *et al.*, 2010). La Figura 43 muestra el mecanismo de transporte de K^+ que proponemos teniendo en cuenta los resultados obtenidos en este trabajo.

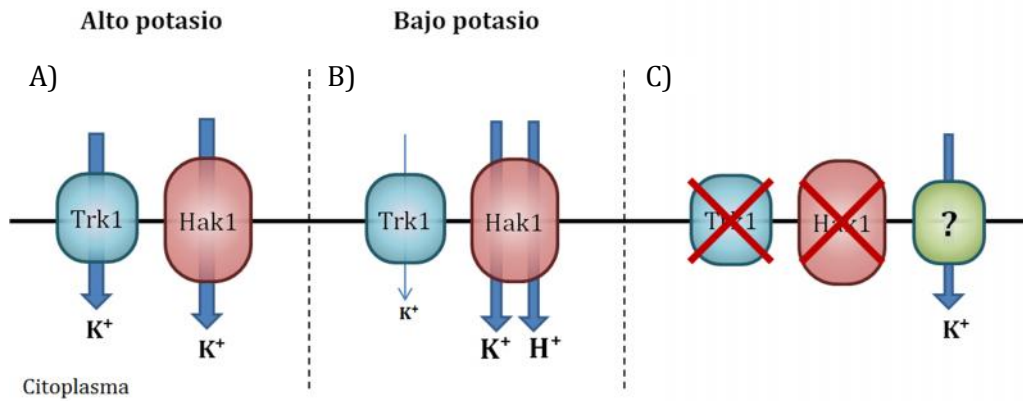


Figura 43. Modelo propuesto para el mecanismo de transporte de K^+ en *H. polymorpha*. En condiciones no limitantes de potasio, la expresión de HAK1 no estaría activada y, aunque Trk1 y Hak1 podrían colaborar en la absorción de K^+ , es concebible un cierto papel de Trk1 en el transporte (A). Cuando el potasio está restringido, Hak1 actúa como transportador principal, pasando la función Trk1 a un segundo plano. En otros organismos se ha propuesto que en estas condiciones Hak1 funciona acoplado con protones (B). Un tercer transporte de potasio es posible cuando no son funcionales ni Hak1 ni Trk1 en condiciones de potasio medio-alto (C).

Una pregunta que ha quedado sin resolver a lo largo de este trabajo, es la relacionada con el comportamiento del potencial relativo de membrana. En *S. cerevisiae* se ha propuesto que uno de los desencadenantes del transporte ectópico observado en los mutantes *trk1, trk2* es la hiperpolarización de la membrana plasmática que se observa en estos mutantes. Y de igual manera, también se ha descrito que el ayuno de potasio hiperpolariza las células. En

nuestro caso, ambas condiciones (disrupción de los genes de transporte o ayuno de potasio) produjeron una despolarización de la célula. Si la metodología utilizada es correcta, como así lo indican los hechos de que ya ha sido utilizada con éxito en otras levaduras como *S. cerevisiae* y *D. hansenii* (Navarrete *et al.*, 2010; Martínez *et al.*, 2011) y de que la amiodarona hiperpolariza la célula (Figura 39), los resultados indican un comportamiento completamente diferente a lo esperado en *H. polymorpha*. Aunque no tenemos una explicación definitiva para estos hechos, merece la pena señalar que, al igual que en nuestro caso, recientemente se ha publicado que la levadura *Z. rouxii* muestra una despolarización de la membrana plasmática en condiciones de ayuno de potasio (Stříbný *et al.*, 2013) aunque, por otro lado, al igual que ocurre en *S. cerevisiae*, la disrupción de los genes de transporte provoca hiperpolarización. Los resultados obtenidos al medir la acidificación del medio, quizás den una pista para explicar el comportamiento del potencial de membrana. Cualquiera de los mutantes produjo una disminución del pH extracelular más rápida que la observada en la cepa silvestre, lo que podría corroborar que quizás, la regulación de los flujos de protones en *H. polymorpha* podría ser diferente a la que conocemos de la levadura modelo *S. cerevisiae*, donde se ha demostrado que las cepas carentes de los transportadores de membrana de potasio realizan una acidificación del medio más lenta que la cepa silvestre (Lapathitis y Kotyk, 1998)

Aportación a la homeostasis de sodio

En la levadura modelo *S. cerevisiae*, la eliminación de los transportadores de potasio Trk1 y Trk2 conlleva una mayor sensibilidad al estrés salino (Gomez *et al.*, 1996). Este efecto ha sido explicado sobre la base de un incremento en la acumulación de sodio a través del sistema residual e inespecífico actuando en estos mutantes. En este trabajo demostramos que también en *H. polymorpha*, la disrupción de *HAK1* o *TRK1* produce una mayor sensibilidad a sodio y a litio.

Recientemente se ha publicado que algunas levaduras y hongos están dotados de un sistema de transporte con alta afinidad por sodio (Benito *et al.*,

2004). Nosotros demostramos en este trabajo que la situación en la levadura *H. polymorpha* es diferente. Ni la cepa silvestre ni los diversos mutantes $\Delta hak1$, $\Delta trk1$ o $\Delta hak1\Delta trk1$ fueron capaces de tomar cantidades significativas de sodio o litio del medio cuando estos cationes se encontraban a concentraciones micromolares. Sin embargo, resulta muy interesante el hecho de que el mutante $\Delta trk1$ fue mucho más sensible que el mutante $\Delta hak1$, cuando en este trabajo se ha descrito un papel mucho más importante en la homeostasis de potasio para el transportador Hak1 que para Trk1. Efectivamente, el mutante $\Delta trk1$ creció mucho más lento, acumuló más sodio y menos potasio que la cepa silvestre o que el mutante $\Delta hak1$ en presencia de NaCl. Más sorprendente aún fue el hecho de que el doble mutante $\Delta hak1\Delta trk1$ recuperara en buena medida la capacidad de tolerar sodio y acumulara menos sodio en comparación con la cepa $\Delta trk1$. Al mismo tiempo, como hemos comentado anteriormente, con la disrupción de *TRK1*, la expresión de *HAK1* se vio favorecida y este hecho fue más evidente en presencia de sodio. Todos estos hechos son congruentes con una situación en la que *TRK1* regularía negativamente de alguna manera la expresión de *HAK1* en *H. polymorpha*. En presencia de sodio y en ausencia de *TRK1*, la expresión de *HAK1* se vería favorecida y esta cepa transportaría más sodio al interior celular y se haría más sensible. Esto podría explicar la reversión del fenotipo de sensibilidad a sodio en los mutantes $\Delta hak1\Delta trk1$. De hecho en *D. hansenii* se ha propuesto que en presencia de sodio, el simporte $K^{+}:H^{+}$ característico del transportador Hak1 funcionaría como un simporte $K^{+}:Na^{+}$ favoreciendo la entrada de este catión en determinadas condiciones (Martínez *et al.*, 2011).

Esta hipótesis se ve apoyada por los resultados obtenidos con las cepas carentes del gen de la calcineurina, $\Delta cnb1$ y $\Delta cnb1\Delta trk1$. La calcineurina es una proteína fosfatasa activada por Ca^{2+} -calmodulina. La Dr. E. Cabrera durante el desarrollo de su Tesis (2012) determinó mediante ensayos de inmunoblots que en ausencia de potasio los niveles de Hak1 son casi indetectables en mutantes $\Delta cnb1$, demostrando así que la expresión de *HAK1* en respuesta a la ausencia de K^{+} es mediada por la calcineurina. El hecho de que el mutante $\Delta cnb1\Delta trk1$ tolere más

sodio y acumule menos cantidad de este catión que el mutante $\Delta trk1$ podría ser explicado gracias a la falta de proteína Hak1 en estos mutantes. Cabe destacar que, recientemente se ha demostrado por primera vez como la calcineurina actúa directamente en la desfosforilación de una α -arrestina regulando la función del tráfico vacuolar de ésta última (O'Donnell *et al.*, 2013). Esto mismo es lo que podría estar ocurriendo con la función de Hak1. La información aportada durante la presente Tesis en las condiciones estudiadas sugiere el mecanismo de transporte de entrada de Na^+ que se muestra en la Figura 44. Este modelo tiene que completarse, pero contiene las principales funciones del sistema.

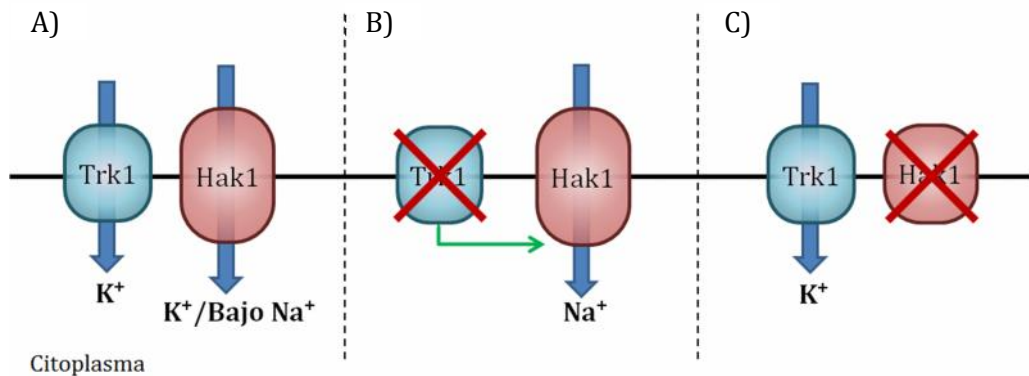


Figura 44. Esquema propuesto del mecanismo de transporte de Na^+ en *H. polymorpha*. En presencia de potasio no limitante y elevado sodio: Hak1 transporta bajas cantidades de sodio (A); la ausencia de *TRK1* estimula el transporte de sodio a través de Hak1 (B); cuando *HAK1* está ausente, Trk1 solamente transporta potasio (C)

En resumen, en esta Tesis se han abordado diversos aspectos de la homeostasis de cationes en *Hansenula polymorpha* y se ha aportado información al estudio de la regulación del transporte de potasio y sodio en esta levadura. Hemos caracterizado los requerimientos y el transporte de potasio en *H. polymorpha*, y hemos estudiado la respuesta a estrés salino. Es mucho el trabajo que aún queda por hacer. Los resultados obtenidos en relación a las variaciones en el potencial relativo de membrana, todo lo relacionado con los mecanismos moleculares del

transporte o la existencia de un posible transportador de potasio son algunos de los muchos interrogantes que aún quedan por responder pero, sin duda alguna, un resultado claro de los estudios que se han llevado a cabo es que Hak1 y Trk1 desempeñan funciones imprescindibles en los procesos de homeostasis de cationes a nivel celular.

CONCLUSIONES

- Los genes denominados *HAK1* y *TRK1* codifican los principales transportadores de potasio de *Hansenula polymorpha*.
- Hak1 es un sistema de transporte de potasio de alta afinidad requerido para crecer a bajas concentraciones de potasio.
- *HpHAK1* está fuertemente regulado a nivel transcripcional y su expresión se estimula en condiciones limitantes de potasio. *HpTRK1* no está significativamente regulado transcripcionalmente y parece mantener una expresión constitutiva.
- Trk1 tiene un papel fundamental en la halotolerancia de *H. polymorpha*. La ausencia de *HpTRK1* provoca sensibilidad a sodio y estimula la expresión de *HpHAK1*, especialmente en presencia de sodio.
- Proponemos que a través del transportador Hak1 las células de *H. polymorpha* acumulan más cantidad de sodio y litio, haciendo a la cepa más sensible a estos cationes. En este proceso jugaría un papel importante la proteína fosfatasa calcineurina.
- Tanto el ayuno como la mutación de *HAK1* o *TRK1* inducen despolarización de las células de *H. polymorpha*. Este fenómeno es totalmente contrapuesto a lo descrito previamente en la levadura modelo *S. cerevisiae*.

DISCUSSION AND CONCLUSIONS

DISCUSSION

H. polymorpha is a methylotrophic thermotolerant non-conventional yeast, that is able to grow at over 50 °C. The increasing interest on this organism is based on the great diversity of areas in which it can be useful. On one hand it is interesting in the field of industrial microbiology (e.g. in the production of recombinant proteins on an industrial scale) and on other hand it is considered a model for research (e.g. in the study of methanol metabolism and nitrate assimilation).

Prior to this work the published information on potassium and sodium homeostasis in *H. polymorpha* has been very limited. Thanks to a previous investigation in the laboratory of Dr. J.M. Siverio (ULL), we know that Ure2 protein contributes to Na⁺/Li⁺ tolerance of *H. polymorpha*, upregulating the *ENA1* expression, besides participating in nitrogen catabolite repression (Rodríguez *et al.*, 2010).

Most yeasts are endowed with two plasma membrane potassium transport systems (Hak and/or Trk). For example *S. cerevisiae* and *S. pombe* have two transporters belong to the Trk family (Tr1 and Trk2) while *D. hansenii* and *D. occidentalis* have one transporter of each type (Hak1 and Trk1). However, there are exceptions and some yeasts such as *Z. rouxii* and *C. glabrata*, among others, seem to possess only one potassium transporter (Trk1) (Stříbný *et al.*, 2012). The fact that most yeasts possess more than one efficient potassium transport system in the plasma membrane, demonstrates the importance of the role of potassium for yeast. In a previous work to this Thesis, the group of Dr. Siverio identified in *H. polymorpha* genome two sequences with high similarity to *TRK1* and *HAK1* of *D. occidentalis* (formerly called *Schwannyomyces occidentalis*). In that work a first comparison with other homologous genes was performed and mutants for these genes were constructed ($\Delta hak1$, $\Delta hak1$ and $\Delta trk1\Delta trk1$) (Martín, 2008; Cabrera 2011; Doctoral Thesis).

In this scenario, we decided to characterize the contribution of these genes to the sodium and potassium homeostasis in *H. polymorpha*, from a biochemical and physiological point of view.

In our case, we used gene sequences obtained thanks to the group of Dr. Siverio, to perform a BLAST analysis, alignments and phylogenetic trees of the encoded proteins. Results confirmed that *HAK* and *TRK* genes belong to evolutionarily distant families and that *HpHak1* has greater similarity to *D. hansenii* and *D. occidentalis* proteins, while *HpTrk1* is more similar to Trk2 protein of *S. cerevisiae* and Trk1 of *D. hansenii*.

Contribution to potassium homeostasis

Two different set of experiments indicate the importance of *HAK1* in *H. polymorpha* potassium fluxes. On one hand, growth assays show a growth defect at low potassium concentrations in mutants with disrupted gene. Moreover, the rubidium (a potassium analogue) transport experiments reinforce this idea, since the transport kinetic constants were severely affected in $\Delta h a k 1$ and $\Delta h a k 1 \Delta t r k 1$ mutants. The K_m of the strains lacking *HAK1* was 100 times higher (1.5 and 1.7 mM) and their V_{max} was 3-4 times lower than wild type and $\Delta t r k 1$ strains. Moreover, under the studied conditions, the contribution of *TRK1* to potassium homeostasis is very limited, since growth and rubidium transport were very little affected by the disruption of this gene. In fact, *TRK1* gene was completely dispensable in any of the studied conditions, in relation to potassium homeostasis.

We have demonstrated that *HAK1* is subjected to strong transcriptional regulation, is expressed under potassium starvation or in the presence of limiting potassium, and its expression is inhibited in the presence of this cation. This is also the case, for example, in *D. occidentalis* yeast (Bañuelos *et al.* 2000). On the other hand we have observed that *TRK1* expression was practically not regulated under the experimental studied conditions in this work. This is in agreement with the

information reported for *D. occidentalis* (Bañuelos *et al.*, 2000) or *D. hansenii* (Prista *et al.*, 2007, Martínez *et al.*, 2011) where there is not experimental evidence of a *TRK1* transcriptional regulation. Very recently a constitutive expression of this gene has been demonstrated also in *Neurospora crassa* (Rivetta *et al.*, 2013). An unexpected result is that in *trk1* mutants, *HpHAK1* expression is increased under the conditions studied (50, 3 and 0.5 mM KCl). These results suggest a role (direct or indirect) of *TRK1* in the regulation of *HAK1* expression.

In *S. cerevisiae* and *S. pombe* double mutants (*trk1trk2*) the kinetics of transport and growth results indicate that they have an ectopic system with low affinity for potassium. They hardly grow at concentrations lower than 10 mM KCl and they possess a very low affinity kinetic, with a K_m higher than 20 mM (Navarrete *et al.*, 2010). However, in our case, the double mutant of *H. polymorpha* ($\Delta hak1\Delta trk1$) grows in much lower potassium concentrations (0.5 mM KCl) and shows a similar growth to wild strain in the presence of 5 mM potassium. It is also worth noting that, this strain has a higher affinity constant than *S. cerevisiae* wild type (K_m for rubidium of 4.5 mM). A preliminary analysis of the *H. polymorpha* genome do not show evidence on the presence of an additional potassium transporter, but the results obtained in this study suggest the possible existence of a third different protein involved in the K^+ transport with some specificity for the cation. The existence of a yeast species that carries three transporters in the plasma membrane mediating K^+ influx is not an exception, since it has been shown that *Pichia stipitis* and *Pichia sorbitophila* yeast, endowed with *HAK1* and *TRK1* genes, also carry a gene belonging to the family of Acu ATPases (Alkali Cation Uptake), which mediates K^+ and Na^+ uptake (Benito *et al.* 2004; Arino *et al.*, 2010). The following figure shows the K^+ transport model that we propose according to the results obtained in this work (Figure 45).

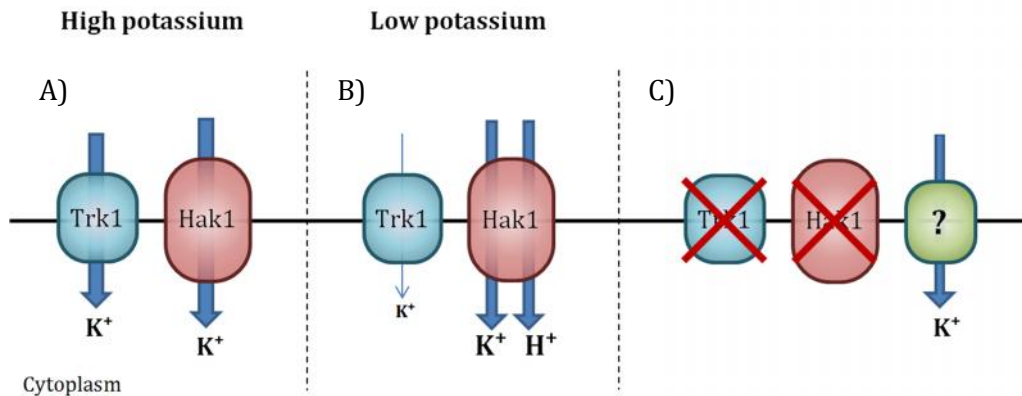


Figure 45. Model of the mechanism proposed for K^+ transport in *H. polymorpha*. Under non-limiting conditions, *HAK1* expression would not be triggered, and Hak1 and Trk1 may contribute in the K^+ absorption, although Trk1 may have some role in transport (A). Under limiting conditions, Hak1 functions as the main transporter. In other organisms has been proposed that under these conditions Hak1 works as a proton cotransporter (B). The existence of a third potassium transport is possible when Trk1 or Hak1 are not functional under medium-high potassium (C).

A question that remains open in this work is related to the behavior of the relative potential plasma-membrane. In *S. cerevisiae* it has been shown that strains lacking the Trk proteins (*trk1, trk2* mutants) show a hyperpolarized plasma membrane. In the same way, it has also been published that potassium starvation hyperpolarizes both wild type and *trk* mutant cells. In our case, both conditions (disruption of genes encoding the potassium transporters or K^+ -starvation) caused a depolarization of the cell. If our methodology is correct, as indicated by the facts that: (i) it has been used successfully in other yeasts such as *S. cerevisiae* and *D. hansenii* (Navarrete *et al.*, 2010, Martínez *et al.*, 2011) and that (ii) amiodarone hyperpolarizes the cell (Figure 39), the results indicate a completely different and unexpected behavior in *H. polymorpha*. Although we have no a definitive explanation for these facts, it is worth noting that, as in our case, it was recently reported that the yeast *Z. rouxii* shows a depolarization of the plasma membrane under K^+ -starvation conditions (Střibný *et al.*, 2013). The results obtained by measuring the external medium acidification, may give a clue to understand the behavior of the membrane potential. Any of the potassium transport mutants produced a faster decrease of extracellular pH than the wild strain, suggesting that

perhaps regulation of proton fluxes of *H. polymorpha* might be different to what we know for the model yeast *S. cerevisiae* in which it has been demonstrated that strains lacking the K⁺ transporters show a slower acidification of external medium than the wild strain (Lapathitis and Kotyk, 1998)

Contribution to sodium homeostasis

S. cerevisiae mutants lacking the potassium transporters Trk1 and Trk2 are sensitive to salt stress (Gomez *et al.*, 1996). This effect has been explained on the basis of an increase in the accumulation of sodium through the residual and unspecific system acting in these mutants. In this work we show that also in *H. polymorpha*, the disruption of *TRK1* or *HAK1* produces higher sodium and lithium sensitivity.

It was recently reported that some yeasts and fungi are endowed with a transport system with high affinity for sodium (Benito *et al.*, 2004). We demonstrate in this work that the situation in *H. polymorpha* is different. Neither the wild strain nor the mutants (Δ *hak1*, Δ *trk1* or Δ *hak1* Δ *trk1*) were able to transport significant amounts of sodium or lithium when these cations were found at micromolar concentrations in the medium. However, it is very interesting that the mutant Δ *trk1* was much more sensitive than the mutant Δ *hak1* although in this work we have described that Hak1 has a much more important role in potassium homeostasis than Trk1. The mutant Δ *trk1* grew much slower, accumulated more sodium and less potassium than wild type and Δ *hak1* strains in the presence of NaCl. More surprising was the fact that the double mutant Δ *hak1* Δ *trk1* recovered much of the ability to tolerate sodium and accumulated less sodium compared with Δ *trk1*. We have mentioned before, that *HAK1* expression is activated in *trk1* mutants, this effect was even more evident in the presence of sodium. All these facts are in agreement with a scenario in which *TRK1* would somehow regulate negatively the *HAK1* expression in *H. polymorpha*. In the presence of sodium and in the absence of *TRK1*, the expression of *HAK1* would be triggered and this strain would transport more sodium into the cell and would become more sensitive. This

could explain the reversion of the phenotype of sodium sensitivity in the double mutant $\Delta hak1\Delta trk1$. In fact, it has been proposed that in *D. hansenii*, the characteristic $K^+::H^+$ symporter of the Hak1 transporter would function as a $K^+::Na^+$ symporter in the presence of sodium. This supports the idea of a Hak1 mediated sodium transport process under certain conditions (Martínez *et al.*, 2011).

This hypothesis is supported by the results obtained with strains lacking calcineurin gene, $\Delta cnb1$ and $\Delta trk1\Delta cnb1$. The calcineurin is a protein phosphatase activated by Ca^{2+} -calmodulin. Dr. E. Cabrera during the development of her thesis (2012) showed by immunoblot assays that in the absence of potassium Hak1 levels are almost undetectable in $\Delta cnb1$ mutants. This result indicates that *HAK1* expression in response to K^+ starvation is mediated by calcineurin. The fact that $\Delta trk1\Delta cnb1$ tolerates more sodium and accumulates lower amount of this cation than $\Delta trk1$ could be explained by the lack of Hak1 protein. It is worth noting that, it has recently been reported for the first time that the dephosphorylation of a α -arrestin by calcineurin regulates the vacuolar trafficking function of the α -arrestin (O'Donnell *et al.*, 2013). This is what might be occurring with Hak1 function. The model in Figure 46 summarizes our results concerning sodium homeostasis. This model has to be refined but contains the main players of the system.

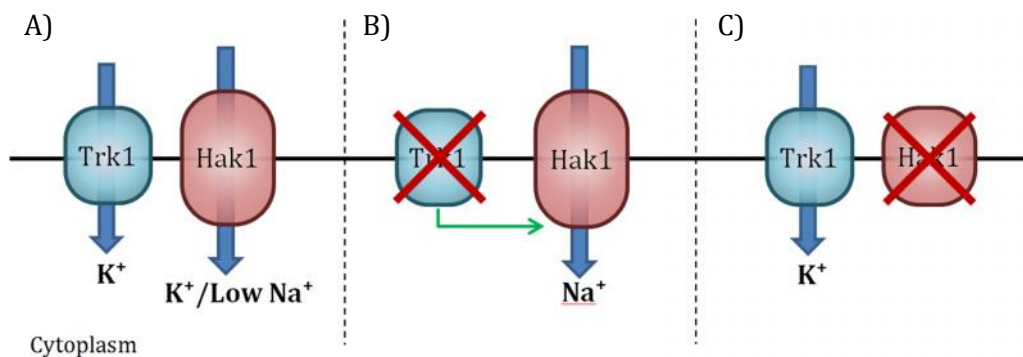


Figure 46. Model of the mechanism proposed for Na^+ transport in *H. polymorpha*. Under non-limiting potassium and high sodium conditions: Hak1 transports low amounts of sodium (A), the disruption of *TRK1* stimulates sodium transport through Hak1 (B), when *HAK1* is interrupted, Trk1 transport mostly potassium (C)

In summary, in this Thesis we have studied several aspects of potassium and sodium homeostasis in *Hansenula polymorpha* and some information on the regulatory processes of sodium and potassium transport are provided. We have characterized potassium requirements and potassium transport kinetics in *H. polymorpha*, and we have studied the growth response to salt stress. A lot of work remains to be done. The results obtained in relation to changes in the relative plasma-membrane potential, everything related to the molecular mechanisms of transport or the existence of a possible potassium transporter are some of the many questions that still remain open. In any case, a fundamental result of this work is that Hak1 and Trk1 play essential roles in the cation homeostasis processes of *H. polymorpha*.

CONCLUSIONS

- *HAK1* and *TRK1* genes encode the main potassium transporters of *Hansenula polymorpha*.
- *HAK1* is a high-affinity potassium transport system required to grow at low potassium concentrations.
- *HpHAK1* is strongly induced in response to limiting potassium conditions. *HpTRK1* is not significantly transcriptionally regulated.
- *Trk1* has a fundamental role in salt tolerance. The absence of *HpTRK1* causes sodium sensitivity and stimulates the expression of *HpHAK1*, especially in the presence of sodium.
- We propose that *Hansenula polymorpha* cells accumulate high amounts of sodium through the *Hak1* transporter, and thereby the *trk1* strain becomes more sensitive to this cation. In this process, the calcineurin protein plays an important role.
- K^+ -starvation or disruption of *HAK1* and/or *TRK1* induces depolarization of *Hansenula polymorpha* cells. This behaviour is totally opposed to the previously described in the model yeast *S. cerevisiae*.

BIBLIOGRAFÍA

- **Almagro A, Prista C, Benito B, Loureiro-Dias MC, Ramos J.** 2001. Cloning and expression of two genes coding for sodium pumps in the salt-tolerant yeast *Debaryomyces hansenii*. J. Bacteriol. 183: 3251–3255.
- **Ambesi A, Miranda M, Petrov VV, and Slayman CW.** 2000. Biogenesis and function of the yeast plasma-membrane H(+)-ATPase. J. Exp Biol. 203: 155–160.
- **Ariño J, Ramos J, Sychrová H.** 2010. Alkali metal cation transport and homeostasis in yeasts. Microbiol Mol Biol. Rev. 74: 95-120
- **Armstrong WM, Rothstein A.** 1964. Discrimination between alkali metal cations by yeast. I. Effect of pH on uptake. J Gen Physiol. 48: 61–71.
- **Armstrong WM, Rothstein A.** 1967. Discrimination between alkali metal cations by yeast. II. Cation interactions in transport. J Gen Physiol. 50: 967–988.
- **Bakker EP.** 1992. Aminoglycoside and aminocyclitol antibiotics: hygromycin B is an atypical bactericidal compound that exerts effects on cells of *Escherichia coli* characteristics for bacteriostatic aminocyclitols. J Gen Microbiol. 138: 563-569.
- **Bañuelos MA, Klein RD, Alexander-Bowman SJ, Rodriguez-Navarro A.** 1995. A potassium transporter of the yeast *Schwanniomyces occidentalis* homologous to the Kup system of *Escherichia coli* has a high concentrative capacity. EMBO J. 14: 3021–3027.
- **Bañuelos MA, Sychrová H, Bleykasten-Grosshans C, Souciet JL, Potier S.** 1998. The Nha1 antiporter of *Saccharomyces cerevisiae* mediates sodium and potassium efflux. Microbiology 144: 2749–2758.
- **Bañuelos MA, Madrid R, Rodriguez-Navarro A.** 2000. Individual functions of the HAK and TRK potassium transporters of *Schwanniomyces occidentalis*. Mol Microbiol 37: 671–679.
- **Barreto L, Canadell D, Petrežsélyová S, Navarrete C, Maresová L, Pérez-Valle J, Herrera R, Olier I, Giraldo J, Sychrová H, Yenush L, Ramos J, Ariño J.** 2011 A genomewide screen for tolerance to cationic drugs reveals genes important for potassium homeostasis in *Saccharomyces cerevisiae*. Eukaryot Cell. 10: 1241-1250
- **Benito B, Garcíadeblas B, Rodríguez-Navarro A.** 2002. Potassium- or sodium-efflux ATPase, a key enzyme in the evolution of fungi. Microbiology 148: 933-941.
- **Benito B, Garcíadeblás B, Schreier P, Rodríguez-Navarro A.** 2004. Novel P-type ATPases mediate high-affinity potassium or sodium uptake in fungi. Eukaryot Cell 3: 359-368

- **Benito B, Garcíadeblas B, Rodríguez-Navarro A.** 2012. HAK transporters from *Physcomitrella patens* and *Yarrowia lipolytica* mediate sodium uptake. *Plant Cell Physiol.* 53: 1117–1123
- **Bertl A , Ramos J, Ludwig J , Lichtenberg-Fraté H, Reid J, Bihler H, Calero F, Martínez P, Ljungdahl PO.** 2003. Characterization of potassium transport in wild-type and isogenic yeast strains carrying all combinations of *trk1*, *trk2* and *tok1* null mutations. *Mol Microbiol.* 47: 767-780.
- **Bihler H, Slayman CL, Bertl A.** 1998. NSC1: a novel high-current inward rectifier for cations in the plasma membrane of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* 432: 59–64.
- **Bihler H, Gaber RF, Slayman CL, Bertl A.** 1999. The presumed potassium carrier Trk2p in *Saccharomyces cerevisiae* determines an H⁺-dependent, K⁺-independent current. *FEBS Lett.* 447: 115–120.
- **Blatt MR, Slayman CL.** 1987. Role of active potassium transport in the regulation of cytoplasmic pH by nonanimal cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 84: 2737-2741.
- **Boekhout T, Kurtzman CP.** 1996. Non-conventional yeasts in biotechnology. Principles and methods used in yeasts classification, and an overview of currently accepted yeast genera. Springer-Verlag.
- **Boekhout T, Robert V.** 2003. Yeasts in food. Beneficial and detrimental aspects. Woodhead Publishing limited in Food Science and Technology. Woodhead Publishing
- **Böer E, Steinborn G, Kunze G, Gellissen G.** 2007 Yeast expression platforms. *Appl Microbiol Biotechnol* 77: 513–523.
- **Borst-Pauwels GW.** 1981. Ion transport in yeast. *Biochim Biophys. Acta* 650: 88–127.
- **Botstein D, Chervitz SA, Cherry JM.** 1997. Yeast as a Model Organism. *Science.* 277: 1259–1260
- **Cabrera E.** 2011. Tesis Doctoral: Caracterización de los transportadores de nitrato y de potasio en la levadura *Hansenula polymorpha*. Universidad de La Laguna.
- **Calero F, Gómez N, Ariño J, Ramos J.** 2000. Trk1 and Trk2 define the major K(+) transport system in fission yeast. *J Bacteriol.* 182: 394-399.
- **Casado C, Yenush L, Melero C, Ruiz Mdel C, Serrano R, Pérez-Valle J, Ariño J, Ramos J.** 2010. Regulation of Trk-dependent potassium transport by the calcineurin pathway involves the Hal5 kinase. *FEBS Lett,* 584: 2415–2420
- **Conway EJ, O'Malley E.** 1946. The nature of the cation exchanges during yeast fermentation, with formation of 0 degrees O2 N-H ion. *Biochem J.* 40: 59–67.

-
- **Conway EJ, Duggan F.** 1958. A cation carrier in the yeast cell wall. *Biochem J.* 69: 265–274.
 - **Curto M, Valledor L, Navarrete C, Gutiérrez D, Sychrova H, Ramos J, Jorriñ J.** 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.* 73: 2316-2335.
 - **de Souza FS, Gomes SL.** 1998. A P-type ATPase from the aquatic fungus *Blastocladiella emersonii* similar to animal Na,K-ATPases. *Biochim Biophys. Acta* 1383: 183-187.
 - **Eddy AA, Barnett JA.** 2007. A history of research on yeasts 11. The study of solute transport: the first 90 years, simple and facilitated diffusion(1). *Yeast* 24: 1023–1059.
 - **Eldarov MA, Mardanov AV, Beletsky AV, Ravin NV, Skryabin KG.** 2011. Complete sequence and analysis of the mitochondrial genome of the methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha* DL-1. *FEMS Yeast Res.* 11: 464-472
 - **Faber KN, Swaving GJ, Faber F, AB G, Harder W, Veenhuis M, Haima P.** 1992. Chromosomal targeting of replicating plasmids in the yeast *Hansenula polymorpha*. *J Gen Microbiol* 138: 2405–2416.
 - **Faber KN, Haima P, Harder W, Veenhuis M, AB G.** 1994. Highly-efficient electrotransformation of the yeast *Hansenula polymorpha*. *Curr Genet* 25: 305–310.
 - **Fairman C, Zhou X, Kung C.** 1999. Potassium uptake through the TOK1 K⁺ channel in the budding yeast. *J Membr Biol.* 168: 149–157.
 - **Filyak Y, Finiuk N, Mitina N, Bilyk O, Titorenko V, Hrydzhuk O, Zaichenko A, Stoika R.** 2013. A novel method for genetic transformation of yeast cells using oligoelectrolyte polymeric nanoscale carriers. *Biotechniques.* 54: 35-43
 - **Flores CL, Rodríguez C, Petit T, Gancedo C.** 2000. Carbohydrate and energy-yielding metabolism in non-conventional yeasts. *FEMS Microbiol Rev.* 24: 507-529.
 - **Forment J, Mulet JM, Vicente O, Serrano R.** 2002. The yeast SR protein kinase Sky1p modulates salt tolerance, membrane potential and the Trk1,2 potassium transporter. *Biochim. Biophys Acta* 1565: 36-40.
 - **Gaber RF, Styles CA, Fink GR.** 1988. *TRK1* encodes a plasma membrane protein required for high-affinity potassium transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol.* 8: 2848–2859.
 - **Garciadeblas B, Rubio F, Quintero FJ, Bañuelos MA, Haro R, Rodríguez-Navarro A.** 1993. Differential expression of two genes encoding isoforms of the ATPase involved in sodium efflux in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Gen Genet.* 236: 363-368.

- **Garciadeblas B, Barrero-Gil J, Benito B, Rodríguez-Navarro A.** 2007. Potassium transport systems in the moss *Physcomitrella patens*: *pphak1* plants reveal the complexity of potassium uptake. *Plant J.* 52: 1080–1093.
- **Gaskova D, Brodska B, Herman P, Vecer J, Malinsky J, Sigler K, Benada O, Plasek J.** 1998. Fluorescent probing of membrane potential in walled cells: diS-C-3(3) assay in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 14: 1189–1197
- **Gelis S, Curto M, Valledor L, González A, Ariño J, Jorrín J, Ramos J.** 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.* 1: 182-193
- **Gellisen, G.** 2002. *Hansenula polymorpha*: Biology and applications. WILEY-VCH. Verlag GmbH, Weinheim.
- **Gellissen G, Kunze G, Gaillardin C, Cregg JM, Berardi E, Veenhuis M, van der Klei I.** 2005. New yeast expression platforms based on methylotrophic *Hansenula polymorpha* and *Pichia pastoris* and on dimorphic *Arxula adenivorans* and *Yarrowia lipolytica* – a comparison. *FEMS Yeast Res* 5: 1079–1096.
- **Gierth M, Mäser P, Schroeder JI.** 2005. The potassium transporter *AtHAK5* functions in K(+) deprivation-induced high-affinity K(+) uptake and *AKT1* K(+) channel contribution to K(+) uptake kinetics in Arabidopsis roots. *Plant Physiol.* 137: 1105–1114.
- **Goffeau A, Barrell BG, Bussey H, Davis RW, Dujon B, Feldmann H, Galibert F, Hoheisel JD, Jacq C, Johnston M, Louis EJ, Mewes HW, Murakami Y, Philippsen P, Tettelin H, Oliver SG.** 1996. Life with 6000 genes. *Science.* 274: 546-567.
- **Gómez MJ, Luyten K, Ramos J.** 1996. The capacity to transport potassium influences sodium tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol Lett.* 135: 157–160.
- **Greiner T, Ramos J, Alvarez MC, Gurnon JR, Kang M, Van Etten JL, Moroni A, Thiel G.** 2011. Functional HAK/KUP/KT-like potassium transporter encoded by chlorella viruses. *Plant J.* 68: 977-986.
- **Haro R, Garcíadeblas B, Rodríguez-Navarro A.** 1991. A novel P-type ATPase from yeast involved in sodium transport. *FEBS Lett.* 291(2): 189-191.
- **Haro R, Sainz L, Rubio F, Rodríguez-Navarro A.** 1999. Cloning of two genes encoding potassium transporters in *Neurospora crassa* and expression of the corresponding cDNAs in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol* 31: 511–520.

- **Hirata D, Harada S, Namba H, Miyakawa T.** 1995. Adaptation to high-salt stress in *Saccharomyces cerevisiae* is regulated by Ca²⁺/calmodulin-dependent phosphoprotein phosphatase (calcineurin) and cAMP-dependent protein kinase. *Mol Gen Genet.* 249: 257- 264.
- **Hohmann S.** 2002. Osmotic stress signaling and osmoadaptation in yeasts. *Microbiol Mol Biol Rev* 66: 300–372.
- **Ishchuk OP, Voronovsky AY, Abbas CA, Sibirny AA.** 2009. Construction of *Hansenula polymorpha* strains with improved thermotolerance. *Biotechnol Bioeng* 104: 911-919.
- **Jennings DH.** 1995. The physiology of fungal nutrition. Cambridge University Press.
- **Kahm M, Navarrete C, Llopis-Torregrosa V, Herrera R, Barreto L, Yenush L, Ariño J, Ramos J, Kschicho M.** 2012. Potassium starvation in yeast: mechanisms of homeostasis revealed by mathematical modeling. *PLoS Comput Biol.* 8: e1002548.
- **Kang HA, Gellissen G.** 2005. Production of recombinant proteins; Novel Microbial and Eukaryotic Expression Systems. Wiley-Blackwell. pp. 111–142
- **Ke R, Ingram PJ, Haynes K.** 2013. An integrative model of ion regulation in yeast. *PLoS Comput Biol.* 9: e1002879.
- **Ketchum KA, Joiner WJ, Sellers AJ, Kaczmarek LK, Goldstein SA.** 1995. A new family of outwardly rectifying potassium channel proteins with two pore domains in tandem. *Nature* 376: 690–695.
- **Kim EJ, Kwak JM, Uozumi N, Schroeder JI.** 1998. *AtKUP1*: an Arabidopsis gene encoding high-affinity potassium transport activity. *Plant Cell* 10: 51–62.
- **Kinclova-Zimmermannova O, Gaskova D, Sychrova H.** 2006. The Na⁺, K⁺/H⁺ - antiporter Nha1 influences the plasma membrane potential of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res.* 6: 792–800.
- **Kinclova-Zimmermannova O, Zavrel M, Sychrova H.** 2006. Importance of the seryl and threonyl residues of the fifth transmembrane domain to the substrate specificity of yeast plasma membrane Na⁺/H⁺ antiporters. *Mol Membr Biol* 23: 349-361.
- **Ko CH, Buckley AM, Gaber RF.** 1990. *TRK2* is required for low affinity K transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 125: 305–312.
- **Ko CH, Gaber RF.** 1991. *TRK1* and *TRK2* encode structurally related K⁺ transporters in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol.* 11: 4266-4273.
- **Kuroda T, Bihler H, Bashi E, Slayman CL, Rivetta A.** 2004. Chloride channel function in the yeast TRK-potassium transporters. *J Membr Biol.* 198: 177–192.

- **Kurtzman CP, Robnett CJ.** 1998. Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences. *Antonie van Leeuwenhoek* 73: 331-371
- **Lapathitis G, Kotyk A.** 1998. Univalent cation fluxes in yeast. *Biochem Mol Biol Int.* 44: 371-380.
- **Lapathitis G, Kotyk A.** 1998. Different sources of acidity in glucose-elicited extracellular acidification in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem Mol Biol Int.* 46: 973-978.
- **Lebaudy A, Véry AA, Sentenac H.** 2007. K⁺ channel activity in plants: Genes, regulations and functions. *FEBS Lett.* 581: 2357-2366.
- **Levine DW, Cooney CL.** 1973. Isolation and characterization of a thermotolerant methanol-utilizing yeast. *Appl Microbiol* 26: 982-990.
- **Maathuis FJ, Sanders D.** 1994. Mechanism of high-affinity potassium uptake in roots of *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 9272-9276.
- **Madrid R, Gomez MJ, Ramos J, Rodriguez-Navarro A.** 1998. Ectopic potassium uptake in *trk1 trk2* mutants of *Saccharomyces cerevisiae* correlates with a highly hyperpolarized membrane potential. *J Biol Chem.* 273: 14838-14844.
- **Malac J, Urbankova E, Sigler K, Gaskova D.** 2005. Activity of yeast multidrug resistance pumps during growth is controlled by carbon source and the composition of growth-depleted medium: DiS-C₃(3) fluorescence assay. *Int J Biochem Cell Biol.* 37: 2536-2543.
- **Mannazzu I, Guerra E, Ferretty R, Pediconi D, Fatichenti F.** 2000. Vanadate and copper induce overlapping oxidative stress responses in the vanadate-tolerant yeast *Hansenula polymorpha*. *Biochem Biophys Acta.* 1475: 151-156
- **Marešová L, Urbankova E, Gaskova D, Sychrová H.** 2006. Measurements of plasma membrane potential changes in *Saccharomyces cerevisiae* cells reveal the importance of the Tok1 channel in membrane potential maintenance. *FEMS Yeast Res.* 6: 1039-1046.
- **Marešová L, Sychrová H.** 2007 Applications of a microplate reader in yeast physiology research. *BioTechniques* 43: 667-672
- **Marešová L, Muend S, Zhang YQ, Sychrová H, Rao R.** 2009. Membrane hyperpolarization drives cation influx and fungicidal activity of amiodarone. *J Biol Chem* 284: 2795-2802

- **Martín Martín, Y.M.** 2008. Tesis Doctoral: Regulación postraduccional de los sistemas de transporte de nitrato de alta afinidad en la levadura *Hansenula polymorpha*. Papel de Npr1 en el control de la vía de asimilación de nitrato. Universidad de La Laguna.
- **Martín Y, González YV, Cabrera E, Rodríguez C, Siverio JM.** 2011. Npr1 Ser/Thr protein kinase links nitrogen source quality and carbon availability with the yeast nitrate transporter (Ynt1) levels. *J Biol Chem.* 286: 27225–27235.
- **Martínez P, Persson BL.** 1998. Identification, cloning and characterization of a derepressible Na⁺-coupled phosphate transporter in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Gen Genet.* 258: 628-638.
- **Martínez JL, Sychrová H, Ramos J.** 2011. Monovalent cations regulate expression and activity of the Hak1 potassium transporter in *Debaryomyces hansenii*. *Fungal Genet Biol.* 48: 177–184.
- **Martínez-Muñoz GA, Kane P.** 2008. Vacuolar and plasma membrane proton pumps collaborate to achieve cytosolic pH homeostasis in yeast. *J Biol Chem.* 283: 20309–20319.
- **Mendizabal I, Pascual-Ahuir A, Serrano R, de Larrinoa IF.** 2001. Promoter sequences regulated by the calcineurin-activated transcription factor Crz1 in the yeast *ENA1* gene. *Mol Genet Genomics.* 265: 801-811.
- **Mendoza I, Rubio F, Rodriguez-Navarro A, Pardo JM.** 1994. The protein phosphatase calcineurin is essential for NaCl tolerance of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem.* 269: 8792-8796.
- **Merchan S, Bernal D, Serrano R, Yenush L.** 2004. Response of the *Saccharomyces cerevisiae* Mpk1 mitogen-activated protein kinase pathway to increases in internal turgor pressure caused by loss of Ppz protein phosphatases. *Eukaryot Cell.* 3: 100-107.
- **Michel B, Lozano C, Rodríguez M, Coria R, Ramírez J, Peña A.** 2006. The yeast potassium transporter TRK2 is able to substitute for TRK1 in its biological function under low K and low pH conditions. *Yeast* 23: 581-589.
- **Miranda M, Bashi E, Vylkova S, Edgerton M, Slayman C, Rivetta A.** 2009. Conservation and dispersion of sequence and function in fungal TRK potassium transporters: focus on *Candida albicans*. *FEMS Yeast Res.* 9: 278–292.
- **Morais JOF, Maia MHD.** 1959. Estudos de microrganismos encontrados em leitos de despejos de caldas de destilarias de Pernambuco. II. Uma nova especie de *Hansenula*, *H. polymorpha*. *Anais da Escola Superior de Quimica Universidade do Recife* i: 15-20

- **Morsomme P, Slayman CW, Goffeau A.** 2000. Mutagenic study of the structure, function and biogenesis of the yeast plasma membrane H(+)-ATPase. *Biochim Biophys Acta* 1469: 133–157.
- **Mulet JM, Leube MP, Kron SJ, Rios G, Fink GR, Serrano R.** 1999. A novel mechanism of ion homeostasis and salt tolerance in yeast: the Hal4 and Hal5 protein kinases modulate the Trk1-Trk2 potassium transporter. *Mol Cell Biol.* 19: 3328-3337.
- **Murguía JR, Bellés JM, Serrano R.** 1996. The yeast *HAL2* nucleotidase is an in vivo target of salt toxicity. *J Biol Chem.* 271: 29029– 29033.
- **Navarrete C, Petrezselyova S, Barreto L, Martínez JL, Zahrádka J, Ariño J, Sychrova H, Ramos J.** 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.
- **Nieves-Cordones M, Miller AJ, Alemán F, Martínez V, Rubio F.** 2008. A putative role for the plasma membrane potential in the control of the expression of the gene encoding the tomato high-affinity potassium transporter HAK5. *Plant Mol Biol.* 68: 521–532.
- **O'Donnell AF, Huang L, Thorner J, Cyert MS.** 2013. A calcineurin-dependent switch controls the trafficking function of α -arrestin Aly1/Art6. *J Biol Chem.* doi: 10.1074/jbc.M113.478511
- **Ortega MD., Rodríguez-Navarro A.** 1985. Potassium and rubidium effluxes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Z. Naturforsch.* 40c: 721–725.
- **Pattison-Granberg J, Persson BL.** 2000. Regulation of cation-coupled high-affinity phosphate uptake in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol.* 182: 5017-5019.
- **Peñalva MA, Arst HN Jr.** 2002. Regulation of gene expression by ambient pH in filamentous fungi and yeasts. *Microbiol Mol Biol Rev.* 66: 426–446.
- **Pérez-Valle J, Jenkins H, Merchan S, Montiel V, Ramos J, Sharma S, Serrano R, Yenush L.** 2007. Key role for intracellular K⁺ and protein kinases Sat4/Hal4 and Hal5 in the plasma membrane stabilization of yeast nutrient transporters. *Mol Cell Biol.* 27: 5725-5736.
- **Pérez-Valle J, Rothe J, Primo C, Martínez Pastor M, Ariño J, Pascual-Ahuir A, Mulet JM, Serrano R, Yenush L.** 2010. Hal4 and Hal5 protein kinases are required for general control of carbon and nitrogen uptake and metabolism. *Eukaryot Cell.* 9: 1881-1890.
- **Petrezselyova S, Kinclova-Zimmermannova O, Sychrova H.** 2013. Vhc1, a novel transporter belonging to the family of electroneutral cation–Cl⁽⁻⁾ cotransporters,

- participates in the regulation of cation content and morphology of *Saccharomyces cerevisiae* vacuoles. *Biochim Biophys Acta* 1828: 623–631.
- **Pfaffl MW.** 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research* 29, No. 9.
 - **Platará, M., A. Ruiz, R. Serrano, A. Palomino, F. Moreno, and J. Arino.** 2006. The transcriptional response of the yeast Na⁺-ATPase *ENA1* gene to alkaline stress involves three main signaling pathways. *J. Biol. Chem.* 281: 36632–36642.
 - **Portillo F, Mulet JM, Serrano R.** 2005. A role for the non-phosphorylated form of yeast Snf1: tolerance to toxic cations and activation of potassium transport. *FEBS Lett.* 579: 512–516.
 - **Prista C, González-Hernández JC, Ramos J, Loureiro-Dias MC.** 2007. Cloning and characterization of two K⁺ transporters of *Debaryomyces hansenii*. *Microbiology.* 153: 3034–3043.
 - **Ramezani-Rad M, Hollenberg CP, Lauber J, Wedler H, Griess E, Wagner C, Albermann K, Hani J, Piontek M, Dahlems U, Gellissen G.** 2003. The *Hansenula polymorpha* (strain CBS4732) genome sequencing and analysis. *FEMS Yeast Res.* 4: 207-215.
 - **Ramos J, Contreras P, Rodríguez-Navarro A.** 1985. A potassium transport mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch Microbiol* 143: 88–93.
 - **Ramos J, Haro R, Rodríguez-Navarro A.** 1990. Regulation of potassium fluxes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim Biophys Acta.* 1029: 211-217.
 - **Ramos J, Alijo R, Haro R, Rodríguez-Navarro A.** 1994. TRK2 is not a low-affinity potassium transporter in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* 176: 249–252.
 - **Ramos J, Ariño J, Sychrová H.** 2011. Alkali-metal-cation influx and efflux systems in nonconventional yeast species. *FEMS Microbiol Lett.* 317: 1–8
 - **Reinders A, Romano I, Wiemken A, De Virgilio C.** 1999. The thermophilic yeast *Hansenula polymorpha* does not require trehalose synthesis for growth at high temperatures but does for normal acquisition of thermotolerance. *J Bacteriol.* 181: 4665-4668.
 - **Rivetta A, Allen KE, Slayman CW, Slayman CL.** 2013. Coordination of K⁺ transporters in *Neurospora*: *TRK1* is scarce and constitutive, while *HAK1* is abundant and highly regulated. *Eukaryot Cell.* 12: 684-696.
 - **Rodríguez C, Tejera P, Medina B, Guillén R, Domínguez A, Ramos J, Siverio JM.** 2010. Ure2 is involved in nitrogen catabolite repression and salt tolerance via Ca²⁺

- homeostasis and calcineurin activation in the yeast *Hansenula polymorpha* J. Biol. Chem. 285: 37551-37560
- **Rodríguez-Navarro A, Ramos J.** 1984. Dual system for potassium transport in *Saccharomyces cerevisiae*. J Bacteriol. 159: 940–945.
 - **Rodríguez-Navarro A, Blatt MR, Slayman CL.** 1986. A potassium-proton symport in *Neurospora crassa*. J Gen Physiol. 87: 649-674.
 - **Rodríguez-Navarro A.** 2000. Potassium transport in fungi and plants. Biochim Biophys Acta. 1469:1–30.
 - **Rodríguez-Navarro A, Rubio F.** 2006. High-affinity potassium and sodium transport systems in plants. J. Exp. Bot. 57: 1149-1160.
 - **Rothstein A, Enns LH.** 1946. The relationship of potassium to carbohydrate metabolism in baker's yeast. J Cell Physiol. 28:231–252.
 - **Rubio F, Gassmann W, Schroeder JI.** 1995. Sodium-driven potassium uptake by the plant potassium transporter HKT1 and mutations conferring salt tolerance. Science 270: 1660-1663.
 - **Rubio F, Santa-María GE, Rodríguez-Navarro A.** 2000. Cloning of *Arabidopsis* and barley cDNAs encoding HAK potassium transporters in root and shoot cells. Physiol Plant 109: 34-43.
 - **Ruiz A, Ariño J.** 2007. Function and regulation of the *Saccharomyces cerevisiae* ENA sodium ATPase system. Eukaryot Cell. 6: 2175-2183.
 - **Samarão SS, Teodoro CE, Silva CE, Ribeiro CC, Granato TM, Bernardes NR, Retamal CA, Façanha AR, Okorokova-Façanha AL, Okorokov LA.** 2009. V H⁺ ATPase along the yeast secretory pathway: energization of the ER and Golgi membranes. Biochim Biophys Acta. 1788: 303–313.
 - **Saraya R, Krikken AM, Kiel JA, Baerends RJ, Veenhuis M, van der Klei IJ.** 2012. Novel genetic tools for *Hansenula polymorpha*. FEMS Yeast Res. 12: 271–278.
 - **Saroussi S, Nelson N.** 2009. Vacuolar H(+)-ATPase-an enzyme for all seasons. Pflugers Arch. 457: 581–587.
 - **Schlessler A, Ulaszewski S, Ghislain M, Goffeau A.** 1988. A second transport ATPase gene in *Saccharomyces cerevisiae*. J Biol Chem. 263: 19480–19487.
 - **Schroeder JI.** 1988. K⁺ transport properties of K⁺ channels in the plasma membrane of *Vicia faba* guard cells. J Gen Physiol. 92: 667-683.

-
- **Serrano R.** 1983. In vivo glucose activation of the yeast plasma membrane ATPase. *FEBS Lett.* 156: 11–14.
 - **Serrano R, Mulet JM, Rios G, Marquez JA, de Larrinoa IF, Leube MP, Mendizabal I, Pascual-Ahuir A, Proft M, Ros R, Montesinos C.** 1999. A glimpse of the mechanisms of ion homeostasis during salt stress. *Journal of Experimental Botany* 50: 1023-1036.
 - **Seto-Young D, Perlin DS.** 1991. Effect of membrane voltage on the plasma membrane H(+)-ATPase of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem.* 266: 1383–1389.
 - **Shabala S, Cuin TA.** 2008. Potassium transport and plant salt tolerance. *Physiol Plant.* 133: 651–669.
 - **Siverio JM.** 2002. Assimilation of nitrate by yeasts. *FEMS Microbiol Rev.* 26:277–284.
 - **Slayman CL, Sanders D.** 1985. Steady-state kinetic analysis of an electroenzyme. *Biochem Soc Symp.* 50: 11-29.
 - **Stöckmann C, Scheidle M, Dittrich B, Merckelbach A, Hehmann G, Melmer G, Klee D, Büchs J, Kang HA, Gellissen G.** 2009. Process development in *Hansenula polymorpha* and *Arxula adenivorans*, a re-assessment. *Microbial Cell Fact.* 8: 22.
 - **Stríbný J, Kinclová-Zimmermannová O, Sychrová H.** 2012. Potassium supply and homeostasis in the osmotolerant non-conventional yeasts *Zygosaccharomyces rouxii* differ from *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Genet* 58: 255–264.
 - **Teunisson DJ, Hall HH, Wickerham LJ.** 1960. *Hansenula angusta*, an excellent species for demonstration of the coexistence of haploid and diploid cells in a homomallic yeast. *Mycologia* 52: 184-188
 - **van der Klei IJ, Yurimoto H, Sakai Y, Veenhuis M.** 2006. The significance of peroxisomes in methanol metabolism in methylotrophic yeast. *Biochim Biophys Acta.* 1763: 1453–1462
 - **van Zutphen T, Baerends RJ, Susanna KA, de Jong A, Kuipers OP, Veenhuis M, van der Klei IJ.** 2010. Adaptation of *Hansenula polymorpha* to methanol: a transcriptome analysis. *BMC Genomics.* 11: 1.
 - **Wickerham LJ.** 1951. Taxonomy of yeasts. Technical Bulletin 1029, US Dept Agric, Washington DC, USA, pp. 1-56
 - **Wickerham LJ.** 1970. *Hansenula* H et P Sydow, in: *The Yeasts, a Taxonomic Study* 2nd Edn (Lodder J, Ed). North Holland, Amsterdam, The Netherlands, pp. 226-315
 - **Wolf, K.** 1996. Non-conventional yeasts in biotechnology. A handbook. Springer-Verlag, Germany.

- **Wolf K, Breunig K, Barth G.** 2003. Non-conventional yeasts in genetics, biochemistry and biotechnology. Practical protocols. Springer-Verlag, Germany.
- **Wood V, Gwilliam R, Rajandream MA, Lyne M, Lyne R, Stewart A, Sgouros J, Peat N, Hayles J, Baker S, Basham D, Bowman S, Brooks K, Brown D, Brown S, Chillingworth T, Churcher C, Collins M, Connor R, Cronin A, Davis P, Feltwell T, Fraser A, Gentles S, Goble A, Hamlin N, Harris D, Hidalgo J, Hodgson G, Holroyd S, Hornsby T, Howarth S, Huckle EJ, Hunt S, Jagels K, James K, Jones L, Jones M, Leather S, McDonald S, McLean J, Mooney P, Moule S, Mungall K, Murphy L, Niblett D, Odell C, Oliver K, O'Neil S, Pearson D, Quail MA, Rabbinowitsch E, Rutherford K, Rutter S, Saunders D, Seeger K, Sharp S, Skelton J, Simmonds M, Squares R, Squares S, Stevens K, Taylor K, Taylor RG, Tivey A, Walsh S, Warren T, Whitehead S, Woodward J, Volckaert G, Aert R, Robben J, Grymonprez B, Weltjens I, Vanstreels E, Rieger M, Schäfer M, Müller-Auer S, Gabel C, Fuchs M, Düsterhöft A, Fritz C, Holzer E, Moestl D, Hilbert H, Borzym K, Langer I, Beck A, Lehrach H, Reinhardt R, Pohl TM, Eger P, Zimmermann W, Wedler H, Wambutt R, Purnelle B, Goffeau A, Cadieu E, Dréano S, Gloux S, Lelaure V, Mottier S, Galibert F, Aves SJ, Xiang Z, Hunt C, Moore K, Hurst SM, Lucas M, Rochet M, Gaillardin C, Tallada VA, Garzon A, Thode G, Daga RR, Cruzado L, Jimenez J, Sánchez M, del Rey F, Benito J, Domínguez A, Revuelta JL, Moreno S, Armstrong J, Forsburg SL, Cerutti L, Lowe T, McCombie WR, Paulsen I, Potashkin J, Shpakovski GV, Ussery D, Barrell BG, Nurse P.** 2002. The genome sequence of *Schizosaccharomyces pombe*. *Nature*. 415: 871-880.
- **Yenush L, Mulet JM, Ariño J, Serrano R.** 2002. The Ppz protein phosphatases are key regulators of K⁺ and pH homeostasis: implications for salt tolerance, cell wall integrity and cell cycle progression. *EMBO J*. 21: 920-929.

ANEXO

Durante el periodo de realización de mi Tesis Doctoral, he colaborado con diferentes laboratorios en la investigación y avance en el conocimiento de la homeostasis de cationes, no sólo de *Hansenula polymorpha* sino también, de la levadura modelo *Saccharomyces cerevisiae*, de otras levaduras no convencionales como *Debaryomyces hansenii*, e incluso del virus del alga *Chlorella*. Todo este trabajo se ha visto reflejado en diversas publicaciones científicas. Además, parte de los datos descritos en el Capítulo 2 de esta Tesis han sido ya publicados en el artículo científico de Cabrera *et al.* de 2011, llamado “K⁺ uptake systems in the yeast *Hansenula polymorpha*. Transcriptional and post-translational mechanisms involved in high-affinity K⁺ transporter regulation”.

En este apartado ANEXO se incluyen los resúmenes de todos los artículos científicos en cuyo trabajo he formado parte (por orden de publicación), y el artículo completo de Cabrera *et al.* (2011).

2011:

[Plant J](#), 2011 Dec;68(6):977-86. doi: 10.1111/j.1365-3113X.2011.04748.x. Epub 2011 Oct 10.

Functional HAK/KUP/KT-like potassium transporter encoded by chlorella viruses.

[Greiner T](#), [Ramos J](#), [Alvarez MC](#), [Gurnon JR](#), [Kang M](#), [Van Etten JL](#), [Moroni A](#), [Thiel G](#).

Institute of Botany at the Technische Universität Darmstadt, Schnittspahnstrasse 3-5, 64287 Darmstadt, Germany.

Abstract

Chlorella viruses are a source of interesting membrane transport proteins. Here we examine a putative K(+) transporter encoded by virus FR483 and related chlorella viruses. The protein shares sequence and structural features with HAK/KUP/KT-like K(+) transporters from plants, bacteria and fungi. Yeast complementation assays and Rb(+) uptake experiments show that the viral protein, termed HAKCV (high-affinity K(+) transporter of chlorella virus), is functional, with transport characteristics that are similar to those of known K(+) transporters. Expression studies revealed that the protein is expressed as an early gene during viral replication, and proteomics data indicate that it is not packaged in the virion. The function of HAKCV is unclear, but the data refute the hypothesis that the transporter acts as a substitute for viral-encoded K(+) channels during virus infection.

© 2011 The Authors. The Plant Journal © 2011 Blackwell Publishing Ltd.

2012:

[Genetics](#), 2012 Apr;190(4):1355-64. doi: 10.1534/genetics.112.138370. Epub 2012 Feb 23.

Modulation of yeast alkaline cation tolerance by Ypi1 requires calcineurin.

[Marquina M](#), [González A](#), [Barreto L](#), [Gelis S](#), [Muñoz J](#), [Ruiz A](#), [Alvarez MC](#), [Ramos J](#), [Ariño J](#).

Institut de Biotecnologia i Biomedicina and Departament de Bioquímica i Biologia Molecular, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra 08193, Barcelona, Spain.

Abstract

Ypi1 was discovered as an essential protein able to act as a regulatory subunit of the *Saccharomyces cerevisiae* type 1 protein phosphatase Glc7 and play a key role in mitosis. We show here that partial depletion of Ypi1 causes lithium sensitivity and that high levels of this protein confer a lithium-tolerant phenotype to yeast cells. Remarkably, this phenotype was independent of the role of Ypi1 as a Glc7 regulatory subunit. Lithium tolerance in cells overexpressing Ypi1 was caused by a combination of increased efflux of lithium, mediated by augmented expression of the alkaline cation ATPase ENA1, and decreased lithium influx through the Trk1,2 high-affinity potassium transporters. Deletion of CNB1, encoding the regulatory subunit of the calcineurin phosphatase, blocked Ypi1-induced expression of ENA1, normalized Li(+) fluxes, and abolished the Li(+) hypertolerant phenotype of Ypi1-overexpressing cells. These results point to a complex role of Ypi1 on the regulation of cation homeostasis, largely mediated by the calcineurin phosphatase.

FEMS Yeast Res. 2012 Nov;12(7):774-84. doi: 10.1111/j.1567-1364.2012.00827.x. Epub 2012 Jul 20.

The wheat MAP kinase phosphatase 1 confers higher lithium tolerance in yeast.

Zaidi I, González A, Touzri M, Alvarez MC, Ramos J, Masmoudi K, Ariño J, Hanin M.

Laboratory of Plant Protection and Improvement, Centre of Biotechnology of Sfax, University of Sfax, Sfax, Tunisia.

Abstract

The durum wheat TMKP1 gene encodes a MAP kinase phosphatase. When overexpressed in *Saccharomyces cerevisiae*, TMKP1 leads to salt stress tolerance (especially LiCl), which is dependent on the phosphatase activity of the protein. The TMKP1-associated Li(+) resistance is restricted to a galactose-containing medium. Interestingly, this salt tolerance is abolished in the absence of one member of the yeast type 2C Ser/Thr protein phosphatase family (Ptc1) but not when other members such as Ptc2 or Ptc3 are lacking. Increased Li(+) tolerance is not mediated by regulation of the P-type ATPase Ena1, a major determinant for salt tolerance. In contrast, the effect of TMKP1 depends on Hal3 (a negative regulator of Ppz phosphatases) and on the presence of the high-affinity potassium transporters Trk1/Trk2. Tolerance to Li(+) is also abolished in cells lacking the aldose reductase Gre3, previously shown to be involved in the resistance to this cation. This study provides evidence that the wheat TMKP1 phosphatase is contributing to reduce the exacerbated lithium toxicity in galactose-grown cells, in a way that depends on the presence of the potassium Trk transporters.

© 2012 Federation of European Microbiological Societies. Published by Blackwell Publishing Ltd. All rights reserved.

Fungal Genet Biol. 2012 Sep;49(9):755-63. doi: 10.1016/j.fgb.2012.06.008. Epub 2012 Jul 6.

K(+) uptake systems in the yeast *Hansenula polymorpha*. Transcriptional and post-translational mechanisms involved in high-affinity K(+) transporter regulation.

Cabrera E, Álvarez MC, Martín Y, Siverio JM, Ramos J.

Department of Biochemistry and Molecular Biology, Institute of Biomedical Technologies, Nitrogen Metabolism Group, Universidad de La Laguna, E-38206 La Laguna, Tenerife, Canarias, Spain.

Abstract

We have identified the two main K(+) transporters in the yeast *Hansenula polymorpha*. So far this is the only yeast with these transporters amenable to molecular genetic analysis. Two ORF-encoding permeases with high similarity to Trk1 and Hak1 are present in the genome of this yeast. Deletion of either of these genes led to defective growth in low K(+). The K(+) and Rb(+) uptake rates showed high affinity of Hak1 for K(+), while the affinity estimated for Trk1 was two orders of magnitude lower. TRK1 was not transcriptionally regulated and HAK1 was strongly induced in response to very low K(+) and down-regulated by the presence of K(+). This process is clearly dependent on calcineurin. The use of a set of strains carrying mutations affecting intracellular protein trafficking revealed that in response to K(+), Hak1 is endocytosed and degraded in the vacuole, this depending on the ubiquitin ligase Rsp5. This is a first insight into the transcriptional and post-translational mechanisms regulating a high-affinity K(+) transporter (HAK-type transporter) that allows cells to respond and adapt to K(+) availability.

Copyright © 2012 Elsevier Inc. All rights reserved.

2013:

FEMS Yeast Res. 2013 Mar;13(2):180-8. doi: 10.1111/1567-1364.12020. Epub 2012 Nov 23.

Salt and oxidative stress tolerance in *Debaryomyces hansenii* and *Debaryomyces fabryi*.

Michán C, Martínez JL, Álvarez MC, Turk M, Sychrova H, Ramos J.

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Universidad de Córdoba, Córdoba, Spain.

Abstract

We report the characterization of five strains belonging to the halotolerant highly related *Debaryomyces hansenii/fabryi* species. The analysis performed consisted in studying tolerance properties, membrane characteristics, and cation in cell amounts. We have specifically investigated (1) tolerance to different chemicals, (2) tolerance to osmotic and salt stress, (3) tolerance and response to oxidative stress, (4) reactive oxygen species (ROS) content, (5) relative membrane potential, (6) cell volume, (7) K(+) and Na(+) ion content, and (8) membrane fluidity. Unexpectedly, no direct relationship was found between one particular strain, Na(+) content and its tolerance to NaCl or between its ROS content and its tolerance to H(2)O(2). Results show that, although in general, human origin *D. fabryi* strains were more resistant to oxidative stress and presented shorter doubling times and smaller cell volume than food isolated *D. hansenii* ones, strains belonging to the same species can be significantly different. *Debaryomyces fabryi* CBS1793 strain highlighted for its extremely tolerant behavior when exposed to the diverse stress factors studied.

© 2012 Federation of European Microbiological Societies. Published by Blackwell Publishing Ltd. All rights reserved.

[Biochem J](#), 2013 Jul 5. [Epub ahead of print]

Subcellular potassium and sodium distribution in *Saccharomyces cerevisiae* wild type and vacuolar mutants.

[Herrera R](#), [Alvarez MC](#), [Gelis S](#), [Ramos J](#).

Abstract

Living cells accumulate potassium to fulfill multiple functions. It is well documented that the model yeast *Saccharomyces cerevisiae* grows at very different concentrations of external alkali cations and keeps high and low intracellular concentrations of potassium and sodium respectively. However less attention has been paid to the study of the intracellular distribution of these cations. The most widely used experimental approach, plasma membrane permeabilization, produces incomplete results, since it usually considers only cytoplasm and vacuoles as compartments where the cations are present in significant amounts. By isolating and analyzing the main yeast organelles, we have determined subcellular location of potassium and sodium in *S. cerevisiae*. We show that while vacuoles accumulate most of the intracellular potassium and sodium, the cytosol contains relatively low amounts, which is especially relevant in the case of sodium. However potassium concentrations in the cytosol are kept rather constant during the potassium starvation process and we conclude that for that purpose, vacuolar potassium has to be rapidly mobilized. We also show that this intracellular distribution is altered in four different mutants with impaired vacuolar physiology. Finally, we show that both in wild type and vacuolar mutants, nuclei contain and keep a relatively constant and important percentage of total intracellular potassium and sodium, which most probably is involved in the neutralization of negative charges.



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Fungal Genetics and Biology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/yfgbi

K⁺ uptake systems in the yeast *Hansenula polymorpha*. Transcriptional and post-translational mechanisms involved in high-affinity K⁺ transporter regulation[☆]

Elisa Cabrera^{a,1}, María C. Álvarez^b, Yusé Martín^{a,2}, José M. Siverio^{a,*}, José Ramos^{b,*}

^a Department of Biochemistry and Molecular Biology, Institute of Biomedical Technologies (ITB), Nitrogen Metabolism Group, Universidad de La Laguna, E-38206 La Laguna, Tenerife, Canarias, Spain

^b Departament de Microbiologia, Campus de Rabanales Ed. Severo Ochoa, Universidad de Córdoba, E-14071 Córdoba, Spain

ARTICLE INFO

Article history:
Received 21 April 2012
Accepted 19 June 2012
Available online 6 July 2012

Keywords:
Potassium uptake
TRK1
HAK1
Calcineurin
Endocytosis
Hansenula polymorpha

ABSTRACT

We have identified the two main K⁺ transporters in the yeast *Hansenula polymorpha*. So far this is the only yeast with these transporters amenable to molecular genetic analysis. Two ORF-encoding permeases with high similarity to Trk1 and HAK1 are present in the genome of this yeast. Deletion of either of these genes led to defective growth in low K⁺. The K⁺ and Rb⁺ uptake rates showed high affinity of HAK1 for K⁺, while the affinity estimated for Trk1 was two orders of magnitude lower. *TRK1* was not transcriptionally regulated and *HAK1* was strongly induced in response to very low K⁺ and down-regulated by the presence of K⁺. This process is clearly dependent on calcineurin. The use of a set of strains carrying mutations affecting intracellular protein trafficking revealed that in response to K⁺, HAK1 is endocytosed and degraded in the vacuole, this depending on the ubiquitin ligase Rsp5. This is a first insight into the transcriptional and post-translational mechanisms regulating a high-affinity K⁺ transporter (HAK-type transporter) that allows cells to respond and adapt to K⁺ availability.

© 2012 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

K⁺ is an essential macronutrient for living cells to maintain cell volume, turgor and plasma membrane electrochemical potential (Mulet et al., 1999). To cope with natural environment K⁺ availability changes, cells have developed efficient transport systems able to maintain K⁺ homeostasis.

In free-living, cell-walled eukaryotic cells and in plant roots, two K⁺ transporter types, *TRK/HKT* and *HAK/KT/KUP*, have been reported. The first K⁺ transporter gene, now classed within the TRK family, was isolated in *Saccharomyces cerevisiae* (Ramos et al., 1985; Gaber et al., 1988). Later on, several genes coding for K⁺ transport systems in other yeast, filamentous fungi and plants were identified, cloned and studied. K⁺ uptake in *S. cerevisiae* is

mediated by two TRK transporters, *TRK1* and *TRK2*, but transport depends mainly on *TRK1*. The typical structure of *TRK1* contains four sequential M1PM2 elements of the TRK-HKT transporters, made up of an N-terminal inner membrane helix (M1), a P-loop region (P) and a C-terminal inner transmembrane helix (M2) (Durell and Guy, 1999). The role of Trk2 in K⁺ supply is only marginal in the presence of *TRK1* (Ko et al., 1990; Ko and Gaber, 1991). Moreover, Trk1 has been claimed to be implicated in the control membrane potential (Madrid et al., 1998). *Schizosaccharomyces pombe* also has two TRK-type transporters (Lichtenberg-Frate et al., 1996; Calero et al., 2000). Gene disruption showed that under standard growth conditions, either of them is able to cope with cell K⁺ requirements. However, under different ion stresses, SpTrk1 seems to be more important than Trk2 (Calero et al., 2004).

Besides TRK transporters, several non-conventional yeasts, *Schwanniomyces occidentalis* (Banuelos et al., 1995; Banuelos et al., 2000), *Debaryomyces hansenii* (Prista et al., 2007) and mycelial fungi such as *Neurospora crassa* (Harot et al., 1999) also present a completely different transporter named HAK-type, which stands for High Affinity K⁺ transporter. HAK transporters are not ubiquitous in yeast and fungi, they are found primarily in species that live in very low K⁺ environments (Grabov, 2007). Thus, they are also present in plants (Santa-Maria et al., 1997; Quintero and Blatt, 1997) and in the moss *Physcomitrella patens* (Garcíadeblas et al.,

Abbreviations: GFP, green fluorescent protein; WT, wild type.

* Nucleotide accession numbers: *HAK1* MI ID: HE605044 EMBL-Bank and *TRK1* HE605045.

* Corresponding authors. Fax: +34 957218650. (J. Ramos), +34 922318354 (J.M. Siverio).

E-mail addresses: jsiverio@ull.es (J.M. Siverio), m11raruj@uco.es (J. Ramos).

¹ Present address: Estabulario-Animalario, Universidad de La Laguna, E-38206 La Laguna, Tenerife, Canarias, Spain.

² Present address: Unidad de Investigación, Hospital Universitario de Canarias, E-38320 Ofra, La Laguna, Tenerife, Canarias, Spain.

1087-1845/\$ - see front matter © 2012 Elsevier Inc. All rights reserved.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.fgb.2012.06.008>

2007). The first eukaryotic HAK transporter gene was cloned from *S. occidentalis* (Banuelos et al., 1995), and it was proposed that *HAK1*, unlike *TRK1*, works mainly at low K^+ and pH, whereas *TRK1* is predominant in all other conditions and controls the membrane potential (Banuelos et al., 2000). In *N. crassa*, *TRK1* is the dominant K^+ transporter, while *HAK1* is only expressed when the cells are suffering K^+ starvation (Haro et al., 1999). In the halotolerant yeast *D. hansenii*, it has recently been reported that Dh*HAK1* expression required K^+ and Na^+ starvation, while Dh*TRK1* is not regulated at transcriptional level (Martinez et al., 2011).

In plants, HAK transporter genes have been found in evolutionarily diverse organisms ranging from green algae to angiosperms. The ubiquitous presence of these genes in these organisms implies that they play an important role in nutrient acquisition and survival in K^+ -poor environments (Grabov, 2007). They were first identified in *Arabidopsis thaliana* and *Hordeum vulgare*. Functional analysis of Hv*HAK1* in yeast showed high affinity for K^+ . Hv*HAK1* also mediated low-affinity Na^+ uptake (Senn et al., 2001) and V366I and R591C substitutions confer enhanced K^+ capture and improved Na^+ and Li^+ tolerance (Mangano et al., 2008). More recently *HAK5* has been characterized in *Solanum lycopersicum* (tomato) and *A. thaliana*. *Hak5* is a Hak-1 type transporter that works as the high-affinity K^+ transporter in plants and it has been reported that the high levels of *AtHAK5* or *LeHAK5* mRNA in plants grown with low K^+ were not observed in the presence of high KCl or NaCl concentrations (Nieves-Cordones et al., 2008; Nieves-Cordones et al., 2010).

In the last few years, diverse factors have been identified in *ScTrk1* regulation, such as the Hal3/Ppz system (Yenush et al., 2002; Yenush et al., 2005) or the SR protein kinase Sky1 (Erez and Kahana, 2001), although the precise mechanisms remain to be elucidated. A pair of partially redundant protein kinases, Hal4 and Hal5, positively regulate the Trk1 transporter and confer salt tolerance when over-expressed (Mulet et al., 1999). Recently, it has been shown that they are required for maintenance of Trk1 at the plasma membrane, particularly when K^+ levels in the medium are low (Perez-Valle et al., 2007). Moreover, Trk1 activity and up-regulation of *HAL5* expression may be dependent on calcineurin (Casado et al., 2010). Calcineurin is a conserved Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein phosphatase that plays a critical role in Ca^{2+} signaling (Stathopoulos and Cyert, 1997). However, in spite of this information, the molecular mechanism of Trk1 regulation and its possible interconnections remain largely unknown. It is known that the genes encoding for HAK-type transporters are up-regulated when external K^+ is scarce. However, unlike *TRK1*, the transcriptional and post-translational regulation mechanisms of HAK-type transporters are largely unexplored.

Hansenula polymorpha (renamed *Pichia angusta* and currently *Ogataea angusta*) is a methylotrophic yeast able to grow in methanol as a sole carbon source (Van der Klei et al., 2006). In addition, this yeast unlike *Saccharomyces cerevisiae*, *Scizosaccharomyces pombe* and *Pichia pastoris* can use nitrate and nitrite as single nitrogen sources (Siverio, 2002). Over the last 2 decades basic genetic tools have been developed for *H. polymorpha* such as transformation systems, vectors, integrative vectors to construct lacZ fusions and gene disruption (Faber et al., 1994; Brito et al., 1999; González et al., 1999). More recently, *H. polymorpha* strains with improved gene disruption rate have been constructed by decreasing the high frequency of random integration in the genome (Saraya et al., 2012). Moreover, the genomes of two widely used *H. polymorpha* strains (CBS4732 and NCYC495) have been sequenced (Ramezani-Rad et al., 2003; <http://genome.jgipsf.org/Hanpo2>) facilitating "omics" approaches (van Zutphen et al., 2010). Thus *H. polymorpha* is an excellent model to study processes such as peroxisome biogenesis and degradation and nitrate assimilation (Van der Klei et al., 2006; Martin et al., 2011). *H. polymorpha* is also valuable in biotechnology to produce several proteins of pharmaceutical importance

by using very strong and inducible promoters of the genes encoding key enzymes of methanol metabolism (e.g. AO, DHAS and formaldehyde dehydrogenase) (Stockmann et al., 2009).

We took advantage of the molecular tools available and here we report the existence of *TRK*- and *HAK*-type K^+ transporters in *H. polymorpha*. *HAK1* is induced at low K^+ , whereas *TRK1* may be involved in membrane potential control. We are gaining insight into the transcriptional and post-translational mechanisms involved in Hp*HAK1* regulation. We found that expression of *HAK1* in response to K^+ starvation is under the control of calcineurin via the transcription factors Crz1 and Gat1. In addition, we found that the presence of K^+ triggers endocytosis and vacuolar degradation of *Hak1*.

2. Materials and methods

2.1. Yeast strains and culture conditions

The *H. polymorpha* strains used in this work and their genotypes are listed in Supplemental Table 1. All strains are derivatives of NCYC495 *leu2 ura3* strain. Yeast cells were grown with shaking at 37 °C in YPD medium (1% (w/v) yeast extract, 2% (w/v) glucose) or synthetic K^+ -free medium (YNB-F) (0.17% (w/v) yeast nitrogen base without amino acids, ammonium sulfate and K^+ (Formedium™, UK) (Navarrete et al., 2010) supplemented with 2% (w/v) glucose, 30 mM ammonium sulfate and the KCl concentration indicated in each case buffered at pH 5.8. K^+ deprivation medium (potassium-free medium) contains all the same, except the KCl. K^+ -starved cells were obtained incubating 20 or 50 mM KCl grown cells in potassium-free medium during the indicated times.

2.2. Disruption of *H. polymorpha* *TRK1* and *HAK1* genes

The *H. polymorpha* DL1 genome data base was screened for putative proteins with high similarity to *S. cerevisiae* *TRK1* and *S. occidentalis* *TRK1* and *HAK1*. Hp*HAK1* and Hp*TRK1* were disrupted with cassettes containing part of the target sequence flanking the *H. polymorpha* marker genes *URA3* or *LEU2*. The genomic sequence used for the construction of the disruption cassettes and for later complementation of mutants was obtained by PCR using Pfu and cloned into the appropriate vectors. Recipient strains were electrotransformed with cassettes, and transformants were selected on the basis of growth in the absence of uracil or leucine. Transformants bearing the disrupted target gene were identified by their deficient growth in starvation potassium medium and by PCR. All the primer sets for PCR-mediated gene disruption, tagging or qRT-PCR are described in Supplemental Table 2. All the vectors are described in Supplemental Table 3.

2.3. Plasmid construction: lacZ gene fusions

The pHP1359 vector was used to fuse *HAK1* gene promoter to lacZ, yielding pP_{HAK1}-lacZ. The region from -1080 to +40 to ATG of *HAK1* was amplified by PCR using Pfu from genomic (Sambrook, 2001).

2.4. Epitope tagging of *Hak1*

Hak1 was tagged at its carboxy terminus with six copies of the peptide epitope from the HA protein of human influenza virus using the vector pHA1 (Rodríguez et al., 2010). The +369 to +2288 region from *HAK1* was cloned in frame with the 6HA sequences to render the vector pHA1-HA. These were linearized at the Apal site to facilitate his homologous integration and used to transform yeast. Transformants were selected by growth on

YPD plates containing 100 µg/ml of Zeocin™ (Invitrogen, USA). HA tagging was confirmed by PCR. Western blot analysis using anti-HA antibody (Roche, Germany) provided further confirmation.

2.5. Gene relative expression levels determination by qRT-PCR

Total RNA was isolated from *H. polymorpha* cells in each treatment described and at the indicated times using the MasterPure™ Yeast RNA Purification kit (Epicentre, USA). cDNA was synthesized using iScript™ cDNA synthesis kit (BioRad, USA) and 2 µl of cDNA were used with iQ™ SYBRGreen supermix (BioRad, USA) in a Bio-Rad MiniOpticon PCR system according to the manufacturer's instructions. Cycle thresholds were normalized to *HpACT1* mRNA levels and expressed relative to normal potassium growth conditions (50 mM KCl).

2.6. Determination of K⁺ and Rb⁺

Variation of external potassium was measured by using cells grown in YNB-F plus 50 mM KCl and K⁺-starved during 4 h. At time zero, cells were transferred (OD₆₀₀ 0.65) to uptake buffer (10 mM MES supplemented with 2% (w/v) glucose, MgCl₂ 0.1 mM at pH 5.8 adjusted with Ca(OH)₂) containing 80 micromolar K⁺ and the time course of K⁺ changes was followed.

To study the characteristics of Rb⁺ uptake, cells were grown and treated as described in each case. The required amount of RbCl was added to the growth medium or to the uptake buffer (K⁺-starved cells) at time zero (OD₆₀₀ 0.3) and aliquots were withdrawn at various times.

To estimate internal K⁺ or Rb⁺, cells were collected on 0.8 µm Millipore filters (Ref. AAWP), which were rapidly washed with 20 mM MgCl₂. The cells were then extracted with acid and the extracts analyzed by atomic emission spectrophotometry (Ramos et al., 1990). The experiments were repeated at least three times and the standard deviations calculated. Internal potassium and rubidium values are expressed as nanomoles per milligram dry weight of cells.

2.7. Yeast cell extract preparation, SDS-PAGE and immunoblotting

100 mg of cells were resuspended in 250 µl of lysis buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 15 mM EDTA, 15 mM EGTA, 10 mM Na₂S₂O₈, 10 mM Na₂P₂O₇, 10 mM NaF plus Complete Mini protease inhibitor mixture (Roche, Germany), and 2 mM phenylmethylsulfonyl fluoride). 0.5 mm Ø glass-beads were added to cell suspension for homogenization in a FastPrep homogenizer device (Thermo Savant LifeSciences, UK) for 20 s at 6.0 m/s. Supernatant was clarified by two consecutive centrifugations at 820g for 1 min. The resulting supernatant was routinely centrifuged at 20,500g for 30 min at 4 °C. Pellets were resuspended in 70 µl of 0.25 mg/ml of Triton X-100 and the mixed with 4× sample buffer (4×: 12% (w/v) SDS, 6% (v/v) 2-mercaptoethanol, 30% (w/v) glycerol, 0.05% (w/v) Serva blue G, 150 mM Tris-HCl, pH 7). Finally, samples were heated at 40 °C for 30 min and then subjected to SDS-PAGE. SDS-PAGE and HAK1 immunodetection were performed as described in (Navarro et al., 2006). HAK1 immunodetection was carried out with 1:1000 mouse anti-HA antibody (Roche, Germany); Pma1, used as load control and plasma membrane marker, was immunodetected with rabbit anti-ScPma1 antiserum (gift of Dr. Serrano, Valencia, Spain). Cell extract preparation and HAK1 immunodetection were performed for a minimum of three independent experiments. Films were documented using the Chemi-Doc™ XRS+(Bio-Rad, USA).

2.8. Expression of HAK1-GFP fusion and fluorescence microscopy

To localize HAK1 in the cell, the chromosomal copy of the *HAK1* was substituted by a fusion of wild-type *HAK1* to GFP. Plasmid pHAK1-GFP was linearized to transform wild-type (WT). Images were obtained under epifluorescence Nikon Eclipse 50i microscope equipped with a 120F camera (Nikon). Vacuole membranes were stained with 10 µM FM4-64 (Molecular Probes, USA) for 15 min at 37 °C with shaking, at least 1.5 h before observation. Processing of images only consisted of cropping areas of interest and adjusting contrast, intensity, and brightness to adequate levels for reproduction.

2.9. Miscellaneous methods

Electrotransformation of yeast cells and growth test were performed as described previously in Faber et al. (1994) and Rodriguez et al. (2010), respectively. β-galactosidase activity were determined as in Brito et al. (1999). Mean values ± S.D. from at least three independent experiments was shown.

3. Results

3.1. Molecular cloning and sequence analysis of *H. polymorpha* potassium transporters

HpTRK1 and HpHAK1 are present in the *H. polymorpha* genome database. HpTRK1 encoded a protein of 1102 residues, with all the characteristic motifs of TRK transporters. These included the typical four sequential M1PM2 elements and the glycine residues conserved in the four P fragments (Durell and Guy, 1999). Moreover there is a conserved GNTXFP motif in M2b. It is remarkable that the P loops of both prokaryotic and eukaryotic transporter keep only a glycine residue of the selective filter residues GYG (Supplemental Fig. S1A), which are absolutely required for K⁺ selectivity in K⁺ channels (Doyle et al., 1998). The comparison with the filamentous fungus *Hebeloma cylindrosporum* Trk1 transporter, electrophysiologically characterized as a system permeable to both Na⁺ and K⁺ (Corratge et al., 2007), did not provide clues in terms of ionic selectivity of HpTrk1, although cannot be excluded that HpTrk1 may transport Na⁺. Between hydrophobic segments 3 and 4, there was a 470 residues moderate identity. Blastp analysis revealed that HpTrk1 presents a moderate identity, about 55%, with Trk1 of different yeasts and fungi such as *Debaryomyces hansenii* (60%), *S. cerevisiae* (about 55% and 59% identity with ScTrk1 and ScTrk2 respectively), *S. pombe* (46% with SpTrk1 and 47% with SpTrk2), *S. occidentalis* (45%) and *N. crassa* (51%) (Supplemental Fig. S1B).

HpHAK1 codes for a protein of about 769 residues, significantly smaller than HpTrk1. Blastp revealed that HpHak1 shows about 45% identity with its orthologs in *S. occidentalis* (SoHak1), *D. hansenii* (DhHak1) or *Candida albicans* (CaHak1). Analysis of the HpHak1 sequence by the TMHMM (Krogh et al., 2001) and Tmpred (Hofmann and Stoffel, 1993) programs predicted twelve transmembrane-spanning domains with a long C-terminal inner membrane helix of about 290 residues, very rich in charged amino acids. Moreover, HpHak1 presented the conserved amino acid sequence in the first transmembrane domain GAIYGDIGTSPLY (Rodriguez-Navarro, 2000) (highly conserved amino acids in bold), characteristic of high-affinity HAK transporters from plants (*H. vulgare*, *A. thaliana*) and some fungi like NcHak1 and SoHak1.

3.2. HAK1 and TRK1 are involved in growth under K⁺ restrictions

To test the role of HpHak1 and HpTrk1 in K⁺ uptake, *Δhak1*, *Δtrk1* and *Δhak1.Δtrk1* null mutant strains were obtained. Growth tests performed in solid media with several K⁺ concentrations and

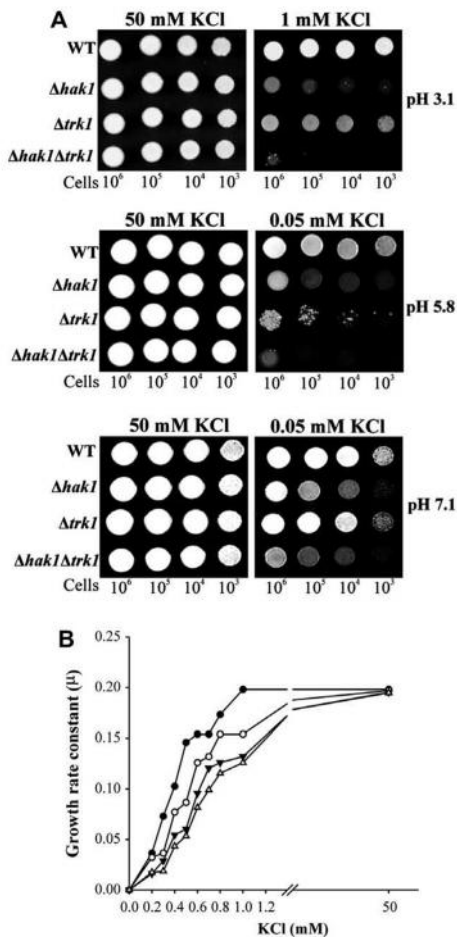


Fig. 1. Low K^+ impairs $\Delta hak1$, $\Delta trk1$ and $\Delta hak1 \Delta trk1$ growth. (A) WT, $\Delta hak1$, $\Delta trk1$ and $\Delta hak1 \Delta trk1$ strains were pre-grown in YPD. Serial 10-fold dilutions were spotted on pH 3.1, 5.8 and 7.1 buffered synthetic medium plus KCl at the indicated concentrations. Cells were incubated at 37 °C for 2 days. Drop tests were repeated three times and a representative experiment is shown. (B) Specific growth rate of WT (●), $\Delta hak1$ (▼), $\Delta trk1$ (○) and $\Delta hak1 \Delta trk1$ (△) strains at different K^+ concentrations. Liquid synthetic medium (YNB-F, pH 5.8) was supplemented with the indicated amounts of KCl, cultures were started at OD_{600} 0.03 and monitored during 48 h. Data in Supplementary Table 4 were used to obtain the graph.

adjusted at different pH values, showed impaired growth of $\Delta hak1$, $\Delta trk1$ and $\Delta hak1 \Delta trk1$ at low K^+ concentration (Fig. 1A). Defective growth at low K^+ was more evident in $\Delta hak1 \Delta trk1$ double mutant at any pH tested, indicating that both Hak1 and Trk1 are involved in yeast growth at limiting K^+ . These experiments also reveal that, at low K^+ , $\Delta hak1$ grows worse than $\Delta trk1$ and that K^+ requirements are higher at pH 3.1. These differences completely disappeared at non-limiting K^+ (50 mM) (Fig. 1A). To gain more detailed information, we further determined the growth rate constants of the four strains at different KCl concentrations (Fig. 1B). These experiments confirmed that, on the one hand $\Delta hak1$ required more K^+ than

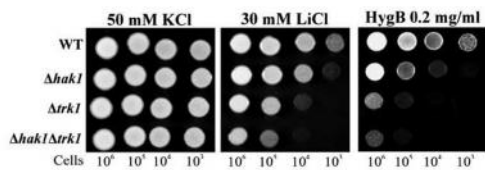


Fig. 2. $\Delta trk1$ is more sensitive to toxic cations than $\Delta hak1$. WT, $\Delta hak1$, $\Delta trk1$ and $\Delta hak1 \Delta trk1$ strains were grown in YPD. Serial 10-fold dilutions were spotted on pH 5.8 buffered synthetic medium supplemented with 50 mM KCl plus LiCl or hygromycin B at the indicated concentrations. Cells were incubated at 37 °C for 2 days. Drop tests were repeated three times and a representative experiment is shown.

$\Delta trk1$, and on the other hand the growth defect at low K^+ was more apparent in the mutant lacking both genes than in any of the single mutants. We concluded that Hak1 and Trk1 are involved in growth in K^+ ranging from 0.005 to 1 mM and that at higher K^+ (10 mM or above), neither Hak1 nor Trk1 are essential for growth. For more details about doubling time data, see Supplemental Table 4.

When cells were subjected to stress produced by toxic cations such as Li^+ and hygromycin B it was observed that the $\Delta trk1$ mutant was more sensitive than the $\Delta hak1$ (Fig. 2), pointing to a possible additional role of Trk1 in conferring resistance to these cationic compounds.

3.3. K^+ and Rb^+ fluxes

Results in Fig. 1 highlight the importance of Hak1 in supporting growth at limiting K^+ . In fact when WT and $\Delta hak1$ cells grown in 50 mM K^+ (internal K^+ around 360 nmol/mg of cells) were K^+ -starved for 4 h, the mutant strain retained less of the cation than WT (220 versus 280 nmol/mg). To gain preliminary insight on K^+ transport characteristics, we analyzed the time course of Rb^+ transport in WT and $\Delta hak1$ cells grown under different conditions. Results in Fig. 3A show that WT and $\Delta hak1$ growing at non-limiting K^+ are able to transport Rb^+ at not very different rates, but at low K^+ or in K^+ -starved, $\Delta hak1$ cells grown under different conditions. Results in Fig. 3B and C, respectively). A very noteworthy result confirmed that observation, when external K^+ variation was monitored after resuspending K^+ -starved cells of both strains in uptake buffer containing micromolar amounts of K^+ (80 μ M KCl) (Fig. 4). While the wild type immediately took K^+ from the medium and almost depleted external K^+ after 1 h incubation, the mutant continuously lost K^+ during the 3 h of the experiment. We did not observe a decrease in viability during the 3 h of the experiment neither in WT nor in $\Delta hak1$ strains (data not shown), thus ruling out the possibility that the loss of potassium from the mutant could be caused by decreased viability and cell leakage. A detailed analysis of the kinetics of Rb^+ transport in 0.5 mM KCl-grown cells (a concentration at which $\Delta hak1$ strain shows impaired growth) and in K^+ -starved cells provide evidence of transport systems working with lower affinity and V_{max} in the mutant cells. The differences when compared with the wild type were especially important in the case of K^+ -starved cells, a condition in which the wild type exhibited for Rb^+ not only around a four times higher V_{max} but also a K_m two orders of magnitude lower than the $\Delta hak1$ mutant (Table 1). These results clearly indicate that Hak1 is a high affinity K^+ transporter.

3.4. HAK1 expression is up-regulated in low K^+ by a calcineurin-dependent response

To study HAK1 expression, $HAK1-lacZ$ and qRT-PCR experiments were performed. HAK1 was strongly induced in response to K^+

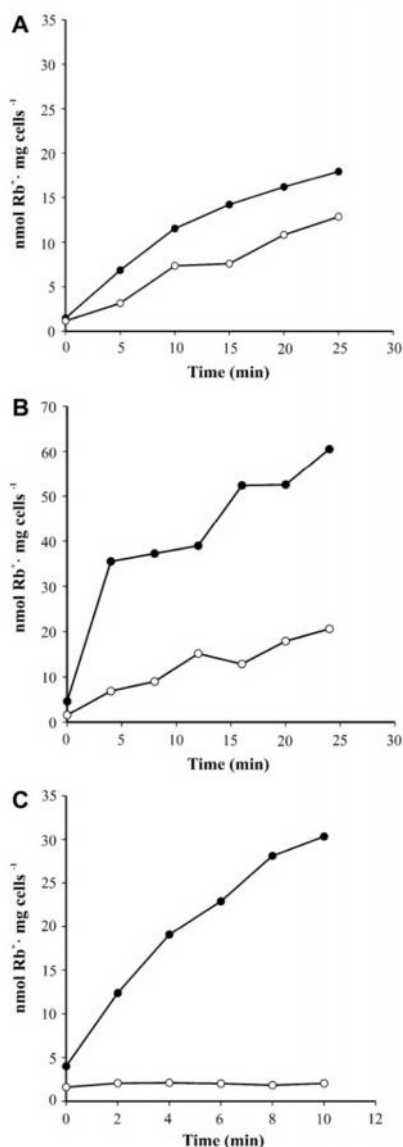


Fig. 3. Time course of Rb⁺ uptake in WT and Δ hak1 strains. WT (●) and Δ hak1 (○) cells were grown in liquid YNB-F medium supplemented with 50 mM KCl (A) or 0.5 mM KCl (B) to an OD₆₀₀ of 0.3. At time zero, RbCl (10 mM) was added, samples were taken at the indicated times and intracellular Rb⁺ was determined. In (C), cells were K⁺-starved during 4 h and then resuspended in uptake buffer without potassium; RbCl 0.01 mM was added at time zero and samples were taken and treated as mentioned above. Experiments were repeated three times and a representative experiment is shown.

restriction (Fig. 5A and B), and it was not expressed under non-limiting K⁺ conditions. *TRK1* expression levels remained unaltered,

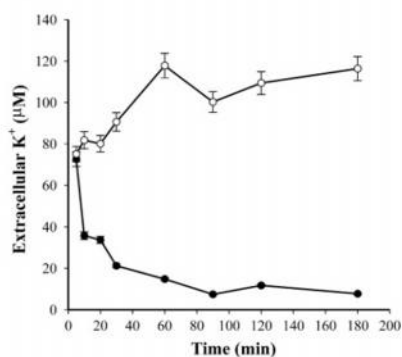


Fig. 4. Variation of external K⁺ in WT and Δ hak1 strains. WT (●) and Δ hak1 (○) cells were grown in synthetic medium (YNB-F) supplemented with 50 mM KCl and K⁺-starved during 4 h. Then cells were resuspended in uptake buffer to OD₆₀₀ 0.65 supplemented with 80 μM KCl. Samples were taken at the indicated times, filtered and K⁺ in the medium was measured. Data are means ± standard errors of three independent experiments.

Table 1

Kinetic parameters for Rb⁺ transport in WT and Δ hak1 strains under two different growth conditions. Cells grown in 0.5 mM KCl or K⁺-starved were resuspended in K⁺-free YNB-F medium or in uptake buffer respectively. Initial rates of uptake were determined as described in material and methods after addition of different concentrations of RbCl. Kinetic parameters of transport were obtained from double reciprocal plots of Rb⁺ transport. Data are means ± standard errors of three independent experiments.

Cultures	0.5 mM KCl grown cells		K ⁺ -starved cells	
	K _m (mM)	V _{max} (mol min ⁻¹ mg ⁻¹)	K _m (mM)	V _{max} (mol min ⁻¹ mg ⁻¹)
WT	0.6 ± 0.02	10.0 ± 1.0	0.01 ± 0.001	12.5 ± 1.0
	10.0 ± 0.5	5.0 ± 0.5	1.7 ± 0.05	3.5 ± 0.5

irrespective of K⁺ concentration (Fig. 5B). It has been reported in *S. cerevisiae* that lack of calcineurin decreases Hal5 protein levels and this affects Trk1 activity, although with little effect on Trk1 amounts (Casado et al., 2010). However, nothing is known about the regulatory mechanisms involved in *HAK1* expression. To investigate this, we tested the growth on low K⁺ medium of mutants lacking the regulatory subunit of calcineurin, *CNB1*, and the calcineurin-dependent transcription factor, *CRZ1*. As shown in Fig. 6, both Δ cnb1 and Δ crz1 display growth defects on this medium. Increasing the external KCl concentration up to 1 mM eliminated these growth defects. Consistent with these results, we observed that *HAK1* promoter region has two putative Calcineurin Dependent Response Elements (CRDEs) (data not shown). Moreover, Δ cnb1 displays very low levels of Hak1 (Fig. 7). These results indicate that the calcineurin/Crz1 signaling pathway is involved in K⁺ uptake regulation by acting on Hak1.

We have established previously that in *H. polymorpha*, the GATA-type transcription factors Gat1 and Gat2 are involved in the calcineurin pathway. Gat1 levels are regulated by calcineurin, while deletion of *GAT2* increased intracellular Ca²⁺ and, as a consequence, activated calcineurin (Rodriguez et al., 2010). Bearing this in mind, we studied the levels of *HAK1-lacZ* and Hak1-6HA in Δ gat1 and Δ gat2 single mutants. In Δ gat1 the levels of *HAK1* (Fig. 8A) and Hak1 protein (Fig. 8B) were lower than in WT, whereas they were higher in Δ gat2. This is consistent with our hypothesis that calcineurin activates *HAK1* expression.

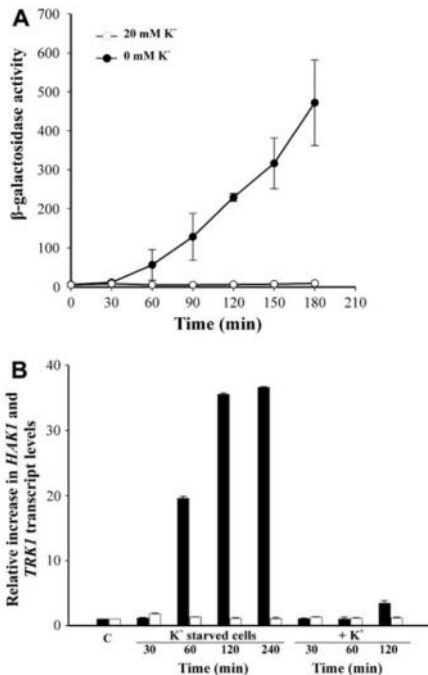


Fig. 5. HpHAK1 and HpTRK1 expression levels. (A) HAK1 expression was followed by assaying β -galactosidase activity in WT bearing HAK1-*lacZ* construct. Cells were grown in pH 5.8 buffered synthetic medium (YNB-F) supplemented with KCl 20 mM to early exponential phase. HAK1 expression was determined in cells incubated in the same medium plus 20 mM KCl (○) or in medium without K⁺ (●). β -galactosidase activity data are means \pm SD of three independent experiments and are expressed as nmol *o*-nitrophenol \cdot min⁻¹ (mU) \cdot mg of protein⁻¹. (B) HAK1 (gray bars) and TRK1 (black bars) transcripts in K⁺-starved cells and in starved cells plus KCl. Cells were grown in synthetic medium buffered at pH 5.8 supplemented with KCl 50 mM to OD₆₀₀ of 1, they were resuspended in the same medium without adding extra K⁺ up to 4 h and then KCl was added (50 mM). At several times HAK1 and TRK1 transcripts were determined by qRT-PCR. Error bars indicate standard errors; duplicate biological samples were used with three replicates each. The expression is normalized to the expression in control medium (YNB-F plus KCl). HpACT1 was used as reference gene.

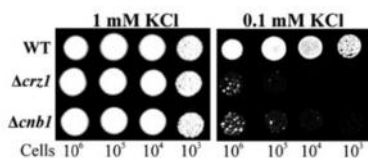


Fig. 6. *Acnbl* and Δ *acr1* display growth defects on low K⁺ medium. WT, *Acnbl* and Δ *acr1* strains were grown in YPD. Serial 10-fold dilutions were spotted on pH 5.8 buffered synthetic medium plus KCl at the indicated concentrations. Cells were incubated at 37°C for 2 days. Drop tests were repeated three times and a representative experiment is shown.

3.5. Post-translational regulation of Hak1

Since nothing is known about Hak1 post-translational regulation in response to the presence of K⁺, we then focused on this. In

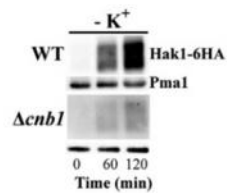


Fig. 7. *CNBL1* deletion decreases Hak1 levels. Hak1-6HA levels were analyzed by SDS-PAGE in WT and Δ *cnbl1*. Cells were grown to early exponential phase in synthetic medium buffered at pH 5.8 plus 20 mM KCl, washed and incubated for 120 min in the same medium but without K⁺. Pma1 was used as loading control. The experiment was repeated three times without significant differences.

accordance with the results in Fig. 5, Hak1 levels increased in response to the absence of K⁺ and were considerably reduced after K⁺ addition to K⁺-starved cells (Fig. 9). Since it is well established that yeast permeases are ubiquitinated, endocytosed and degraded in the vacuole in response to specific stimuli, a set of experiments using mutants with affected intracellular protein trafficking and ubiquitinylation was carried out. In the Δ *end4* strain where endocytosis is impaired (Raths et al., 1993), Hak1 degradation was retarded (Fig. 10A), indicating that Hak1 is endocytosed in response to high K⁺. To provide additional evidence that Hak1 was endocytosed and then routed to the vacuole for degradation, the mutants Δ *pep12* and Δ *vps27* were used. *Pep12* and *Vps27* control entry of biosynthetic (Golgi) and endocytic traffic into the prevacuolar compartment and Multi Vesicular Body (MVB), respectively (Gerrard et al., 2000; Katzmman et al., 2003). In these strains, Hak1 degradation was also slowed down (Fig. 10A), strongly suggesting that Hak1 is indeed routed to the vacuole for its degradation. This was further confirmed using a strain bearing Hak1-GFP, which was observed in the vacuole in response to high K⁺ (Fig. 10B).

Rsp5 is an E3 ubiquitin ligase involved in yeast permease ubiquitinylation (Wang et al., 1999). Since most permeases that undergo endocytosis are ubiquitinated by *Rsp5*, we used the *rsp5.1* temperature-sensitive mutant to check the involvement of this process in Hak1 degradation. In this mutant, Hak1 levels remained almost stable in the presence of K⁺ for 120 min (Fig. 10A), strongly suggesting that Hak1 ubiquitinylation is involved in its internalization and further degradation in the vacuoles.

4. Discussion

HAK and/or TRK K⁺ transporters have been found in different species of yeasts, filamentous fungi and plants (Haro et al., 1999; Rodriguez-Navarro, 2000; Arino et al., 2010; Martinez et al., 2011). While yeasts such as *S. cerevisiae* or *S. pombe* are endowed with two Trk proteins (*Trk1* and *Trk2*), the coexistence of Hak and Trk transporters is common among soil fungi that live in environments with low K⁺ contents such as *S. occidentalis*, *N. crassa* and *H. polymorpha*, and may present an ecological advantage for yeast and filamentous fungi growing in low K⁺ environments. In the present work we have identified the HpTRK1 and HpHAK1 genes, which displayed strong similarities with other genes coding for K⁺ transporters belonging to the TRK and HAK families (Banuelos et al., 1995; Haro et al., 1999; Prista et al., 2007). We report that both transporters are involved in growth at low K⁺ and provide new insights into mechanisms involved in transcriptional and post-translational regulation of HAK transporters. It was somehow surprising that decreasing the external pH from pH 7.1–5.8 (thus favouring high affinity H⁺: K⁺ symport activity) resulted in decreased growth at limiting potassium. We do not have a definitive explanation for this fact since we still lack basic information con-

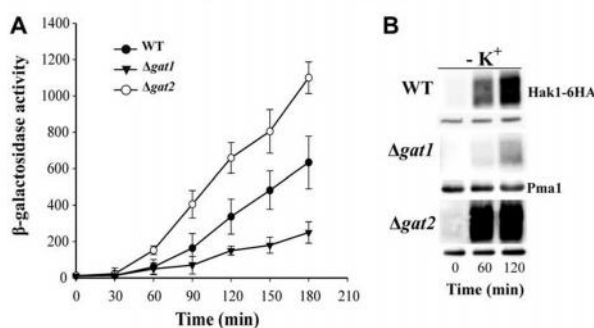


Fig. 8. *GAT1* and *GAT2* deletions affect *HAK1* gene expression and Hak1 protein levels. Cells were grown in pH 5.8 buffered synthetic medium supplemented with KCl 20 mM. (A) *HAK1* expression was determined in cells incubated in the same medium but without K^+ by assaying β -galactosidase activity in WT (\bullet), $\Delta gat1$ (\blacktriangledown) and $\Delta gat2$ (\circ), all bearing *HAK1-lacZ* construct. β -galactosidase activity data are means \pm standard errors of three independent experiments and are expressed as nmol o-nitrophenol min⁻¹ (mU) mg of protein⁻¹. (B) Hak1-6HA levels were analyzed in WT, $\Delta gat1$ and $\Delta gat2$ in medium without K^+ . Samples were taken at the indicated times. Pma1 was used as loading control. The experiment was repeated three times without significant differences.

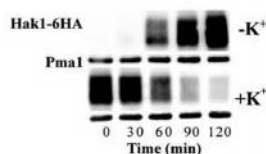


Fig. 9. Effect of K^+ on Hak1 levels in WT. Hak1-6HA levels were analyzed in WT incubated in pH 5.8 buffered synthetic medium without K^+ for 120 min (upper panel) or for 120 min after 20 mM KCl addition (lower panel). Pma1 was used as loading control. The experiment was repeated three times without significant differences.

cerning regulation of K^+ transporters by membrane potential in *Hansenula*, however it is conceivable to think that at more acidic pHi membrane potential may be less negative and this could result in decreased transport capacity.

On the other hand and although search in data base did not provide any direct evidence, the facts that the $\Delta trk1 \Delta hak1$ double mutant was able to grow at K^+ concentrations such as 0.5 mM, showed a growth rate similar to WT at 5 mM KCl and it did transport some Rb^+ at relatively low concentrations of $RbCl$ (0.5 mM) (not shown) make it conceivable to hypothesize about other possible K^+ transporters with low/medium affinity/capacity, different to *HAK1* and *TRK1* in *H. polymorpha*. In fact, *S. cerevisiae* and *S. pombe* double mutants lacking their main K^+ transporters require much higher external K^+ than our $\Delta trk1 \Delta hak1$ *H. polymorpha* strain and they barely grow at concentrations around 10 mM KCl. The existence of a yeast species carrying three plasma membrane K^+ uptake genes would not be unique since it has been already reported for *Pichia stipitis* and *Pichia sorbitophila* which, in addition to *HAK* and *TRK* genes, also carry a gene belonging to the ACU (Alkali Cation Uptake)-ATPases that mediated K^+ and Na^+ uptake (Benito et al., 2004; Arino et al., 2010).

K^+ -starvation triggered expression of Hp*HAK1*, as concluded from mRNA and protein levels and this is consistent with the activity of a high affinity/high V_{max} K^+ (Rb^+) transporter under these conditions. In $\Delta hak1$ the K_m was more than 100 times higher (1.7 mM) than in WT, indicating that Trk1 activity is not essential under restricted K^+ . The contribution of Trk1 and Hak1 to K^+ transport was referenced to V_{max} . Under low K^+ and K^+ starvation conditions respectively, V_{max} attributed to Trk1 were very similar, 5

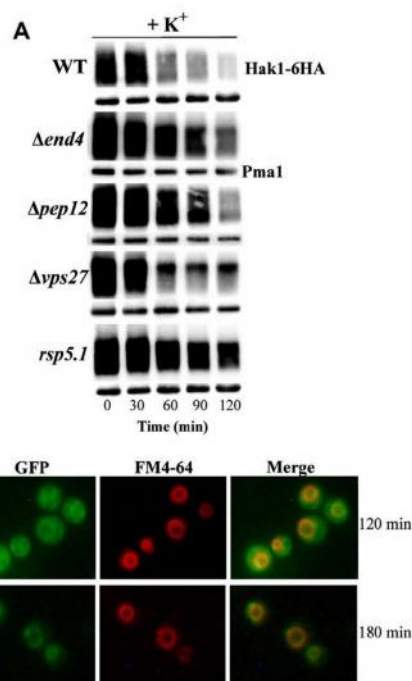


Fig. 10. Hak1 is endocytosed and degraded in the vacuole in response to high K^+ . (A) Immunoblots of Hak1-6HA in WT, $\Delta end4$, $\Delta pep12$, $\Delta vps27$ strains and *rsp5.1* temperature-sensitive mutant after 120 min of K^+ addition. Cells were incubated for 120 min in pH 5.8 buffered synthetic medium without K^+ previously and then 20 mM KCl was added. Pma1 was used as loading control. (B) Hak1-GFP localization in WT cells after 120 min of K^+ deprivation (upper panel) and after 180 min of 20 mM KCl addition to K^+ -starved cells (lower panel). Vacuolar membranes were stained with FM4-64. The experiment was repeated three times without significant differences.

versus 3.5 (nmol min⁻¹ mg of cells⁻¹). However, in the WT the V_{max} , most likely due to Hak1, was about 2 and 4-fold higher than

in *Δhak1* under low K^+ and starvation conditions respectively. This is consistent with the constitutive expression of Trk1 here found for *H. polymorpha* and previously reported in *S. cerevisiae*. These results show Hak1 induction in response to restricted K^+ and also its great contribution to K^+ transport under these conditions. It is therefore conceivable that Trk1 K^+ transport properties could control membrane potential as previously proposed (Madrid et al., 1998).

Expression of HAK genes is usually up-regulated by low K^+ (Haro et al., 1999; Banuelos et al., 2000; Rodríguez-Navarro, 2000; Martínez et al., 2011). We now show that in *H. polymorpha* this response is mediated by calcineurin. In fact *Δcnb1* and *Δcrz1* mutants displayed growth defects in low K^+ medium and *Δcnb1* presented very low levels of Hak1. The GATA transcription factor *GAT1* is regulated by calcineurin in *H. polymorpha* (Rodríguez et al., 2010), consistent with this we found *Δgat1* showed low HAK1 expression and Hak1 levels, indicating that HAK1 is also activated by Crz1 in a process similar to that previously described for *HpENA1* (Rodríguez et al., 2010). Additionally, it is easily understandable that HAK1 expression and Hak1 levels in *Δgat2* are higher than in WT, since we found that *GAT2* deletion increased intracellular Ca^{2+} and consequently triggered calcineurin activation (Rodríguez et al., 2010). In *S. cerevisiae*, it was recently shown that calcineurin regulates HAL5 expression, affecting K^+ transport via Trk1 activity (Casado et al., 2010), now we show for the first time that calcineurin is directly involved in regulating HAK-type transporters.

Concerning post-translational regulation, Hak1 levels strongly increased in the absence of K^+ and they were reduced after K^+ addition. We analyzed Hak1 degradation using mutants with impaired intracellular protein trafficking and ubiquitinylation. Hak1 degradation was retarded in *Δend4*, *Δpep12* and *Δvps27* mutants, revealing that Hak1 is endocytosed and degraded in the vacuole in response to K^+ . A similar process has been reported for *H. polymorpha* nitrate transporter Ynt1 in the presence of glutamine (Navarro et al., 2006) and also has been shown for several *S. cerevisiae* plasma membrane proteins such as Gap1 (General amino acids permease) in ammonium (Springael and Andre, 1998). Moreover, we observed that in the *H. polymorpha* *rsp5-1* temperature-sensitive mutant, Hak1 levels remain almost stable in the presence of K^+ , suggesting that the ubiquitinylation of Hak1, Rsp5 dependent, is necessary for its degradation. Here we provide the first evidence on the ubiquitinylation, endocytosis and vacuolar degradation of a member of the HAK family.

In conclusion, we have identified the main K^+ transporters in *H. polymorpha*, Hak1 and Trk1, gaining insights into the mechanisms involved in transcriptional and post-translational regulation of Hak1. This allows us to propose common regulatory pathways, such as the calcineurin pathway, affecting K^+ transporters in *S. cerevisiae* and *H. polymorpha*, independently of the transporter phylogeny (Trk or Hak-type).

Funding

This work was supported by Grants BFU2010-16192 to JMS and BFU2008-04188-C03-03 to JR from the "Ministerio de Ciencia e Innovación" (MICINN, Spain). EC was a recipient of predoctoral fellowships from "Agencia Canaria de Investigación e Innovación y Sociedad de la Información" (ACIISI), MCA from Universidad de Córdoba and YM from "Ministerio de Investigación y Ciencia" (MEC).

Acknowledgments

The authors thank Rhein Biotech (Germany) for providing HAK1, TRK1 and RSP5 DNA sequences. We are grateful to R. Serrano

(Valencia) for Pma1 antiserum and to Guido Jones for proofreading the manuscript.

Appendix A. Supplementary material

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.fgb.2012.06.008>.

References

- Arino, J., Ramos, J., Sychrova, H., 2010. Alkali metal cation transport and homeostasis in yeasts. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 74, 95–120.
- Banuelos, M.A., Klein, R.D., Exander-Bowman, S.J., Rodríguez-Navarro, A., 1995. A potassium transporter of the yeast *Schwannomyces occidentalis* homologous to the Kup system of *Escherichia coli* has a high concentrative capacity. *EMBO J.* 14, 3021–3027.
- Banuelos, M.A., Madrid, R., Rodríguez-Navarro, A., 2000. Individual functions of the HAK and TRK potassium transporters of *Schwannomyces occidentalis*. *Mol. Microbiol.* 37, 671–679.
- Benito, B., Garcíadeblas, B., Schreier, P., Rodríguez-Navarro, A., 2004. Novel P-type ATPases mediate high-affinity potassium or sodium uptake in fungi. *Eukaryot. Cell* 3, 359–368.
- Brito, N., Perez, M.D., Perdomo, G., Gorzalez, C., García-Lugo, P., Siverio, J.M., 1999. A set of *Hansenula polymorpha* integrative vectors to construct lacZ fusions. *Appl. Microb. Biotechnol.* 53, 23–29.
- Calero, F., Montiel, V., Caracul, Z., Cabello-Hurtado, F., Ramos, J., 2004. On the role of Trk1 and Trk2 in *Schizosaccharomyces pombe* under different ion stress conditions. *FEMS Yeast Res.* 4, 619–624.
- Calero, F., Gomez, N., Arino, J., Ramos, J., 2000. Trk1 and Trk2 define the major K^+ transport system in fission yeast. *J. Bacteriol.* 182, 394–399.
- Casado, C., Yenush, L., Melero, C., Ruiz, D.C., Serrano, R., Perez-Valle, J., Arino, J., Ramos, J., 2010. Regulation of Trk-dependent potassium transport by the calcineurin pathway involves the Hal5 kinase. *FEBS Lett.* 584, 2415–2420.
- Corratge, C., Zimmermann, S., Lambilliotte, R., Plassard, C., Marmeisse, R., Thibaud, J.B., Lacombe, B., Senienac, H., 2007. Molecular and functional characterization of a Na⁺-K⁺ transporter from the Trk family in the ectomycorrhizal fungus *Hebeloma cylindrosporum*. *J. Biol. Chem.* 282, 26057–26066.
- Doyle, D.A., Cabral, J., Pfluetzner, R.A., Kuo, A., Gulbis, J.M., Cohen, S.L., Chait, B.T., MacKinnon, R., 1998. The structure of the potassium channel: molecular basis of K^+ conduction and selectivity. *Science* 280, 69–77.
- Durrell, S.R., Guy, H.R., 1999. Structural models of the KtrB, TrkH, and Trk1.2 symporters based on the structure of the KcsA (K⁺) channel. *Biophys. J.* 77, 789–807.
- Erez, O., Kahana, C., 2001. Screening for modulators of spermine tolerance identifies Sky1, the SR protein kinase of *Saccharomyces cerevisiae*, as a regulator of polyamine homeostasis and ion homeostasis. *Mol. Cell. Biol.* 21, 175–184.
- Faber, K.N., Haima, P., Harder, W., Veenhuis, M., Ab, G., 1994. Highly-efficient electrotransformation of the yeast *Hansenula polymorpha*. *Curr. Genet.* 25, 305–310.
- Gaber, R.F., Styles, C.A., Fink, G.R., 1988. TRK1 encodes a plasma membrane protein required for high-affinity potassium transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 8, 2848–2859.
- Garcíadeblas, B., Barrero-Gil, J., Benito, B., Rodríguez-Navarro, A., 2007. Potassium transport systems in the moss *Physcomitrella patens*: ppk1 plants reveal the complexity of potassium uptake. *Plant J.* 52, 1080–1093.
- Gerrard, S.R., Levi, B.P., Stevens, T.H., 2000. Pep12p is a multifunctional yeast syntaxin that controls entry of biosynthetic, endocytic and retrograde traffic into the prevacuolar compartment. *Traffic* 1, 259–269.
- González, C., Perdomo, G., Tejera, P., Brito, N., Siverio, J.M., 1999. One-step, PCR-mediated, Gene Disruption in the Yeast *Hansenula polymorpha*. *Yeast* 15, 1323–1329.
- Grabov, A., 2007. Plant KT/KUP/HAK potassium transporters: single family – multiple functions. *Ann. Bot.* 99, 1035–1041.
- Haro, R., Sainz, L., Rubio, F., Rodríguez-Navarro, A., 1999. Cloning of two genes encoding potassium transporters in *Neurospora crassa* and expression of the corresponding cDNAs in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Microbiol.* 31, 511–520.
- Hofmann, K., Stoffel, W., 1993. TMDBASE – a database of membrane spanning protein segments. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* 374, 166–170.
- Katzmann, D.J., Stefan, C.J., Babst, M., Emr, S.D., 2003. Vps27 recruits ESCRT machinery to endosomes during MVB sorting. *J. Cell Biol.* 162, 413–423.
- Ko, C.H., Buckley, A.M., Gaber, R.F., 1990. TRK2 is required for low affinity K^+ transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 125, 305–312.
- Ko, C.H., Gaber, R.F., 1991. TRK1 and TRK2 encode structurally related K^+ transporters in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 11, 4266–4273.
- Krogh, A., Larsson, B., von Heijne, G., Sonnhammer, E.L., 2001. Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes. *J. Mol. Biol.* 305, 567–580.
- Lichtenberg-Frate, H., Reid, J.D., Heyer, M., Hofer, M., 1996. The SpTRK gene encodes a potassium-specific transport protein TK1p in *Schizosaccharomyces pombe*. *J. Membr. Biol.* 152, 169–181.
- Madrid, R., Gomez, M.J., Ramos, J., Rodríguez-Navarro, A., 1998. Ectopic potassium uptake in *trk1 trk2* mutants of *Saccharomyces cerevisiae* correlates with a highly hyperpolarized membrane potential. *J. Biol. Chem.* 273, 14838–14844.

- Mangano, S., Silberstein, S., Santa-Maria, G.E., 2008. Point mutations in the barley HvHAK1 potassium transporter lead to improved K⁺-nutrition and enhanced resistance to salt stress. *FEBS Lett.* 582, 3922–3928.
- Martin, Y., Gonzalez, Y.V., Cabrera, E., Rodriguez, C., Siverio, J.M., 2011. Npr1 Ser/Thr protein kinase links nitrogen source quality and carbon availability with the yeast nitrate transporter (Ynt1) levels. *J. Biol. Chem.* 286, 27225–27235.
- Martinez, J.L., Sychrova, H., Ramos, J., 2011. Monovalent cations regulate expression and activity of the Hsk1 potassium transporter in *Debaryomyces hansenii*. *Fungal Genet. Biol.* 48, 177–184.
- Mulet, J.M., Leube, M.P., Kron, S.J., Rios, G., Fink, G.R., Serrano, R., 1999. A novel mechanism of ion homeostasis and salt tolerance in yeast: the Hal4 and Hal5 protein kinases modulate the Trk1–Trk2 potassium transporter. *Mol. Cell. Biol.* 19, 3328–3337.
- Navarrete, C., Petreselyova, S., Barreto, L., Martinez, J.L., Zahradka, J., Arino, J., Sychrova, H., Ramos, J., 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.
- Navarro, F.J., Machin, F., Martin, Y., Siverio, J.M., 2006. Down-regulation of eukaryotic nitrate transporter by nitrogen-dependent ubiquitinylation. *J. Biol. Chem.* 281, 13268–13274.
- Nieves-Cordones, M., Miller, A.J., Aleman, F., Martinez, V., Rubio, F., 2008. A putative role for the plasma membrane potential in the control of the expression of the gene encoding the tomato high-affinity potassium transporter HAK5. *Plant Mol. Biol.* 68, 521–532.
- Nieves-Cordones, M., Aleman, F., Martinez, V., Rubio, F., 2010. The *Arabidopsis thaliana* HAK5 K⁺ transporter is required for plant growth and K⁺ acquisition from low K⁺ solutions under saline conditions. *Mol. Plant.* 3, 326–333.
- Perez-Valle, J., Jenkins, H., Merchan, S., Montiel, V., Ramos, J., Sharma, S., Serrano, R., Yenush, L., 2007. Key role for intracellular K⁺ and protein kinases Sac4/Hal4 and Hal5 in the plasma membrane stabilization of yeast nutrient transporters. *Mol. Cell. Biol.* 27, 5725–5736.
- Prista, C., Gonzalez-Hernandez, J.C., Ramos, J., Loureiro-Dias, M.C., 2007. Cloning and characterization of two K⁺ transporters of *Debaryomyces hansenii*. *Microbiology* 153, 3034–3043.
- Quintero, F.J., Blatt, M.R., 1997. A new family of K⁺ transporters from *Arabidopsis* that are conserved across phyla. *FEBS Lett.* 415, 206–211.
- Ramezani-Rad, M., Hollenberg, C.P., Lauber, J., et al., 2003. The *Hansenula polymorpha* (strain CBS4732) genome sequencing and analysis. *FEMS Yeast Res.* 4, 207–215.
- Ramos, J., Haro, R., Rodriguez-Navarro, A., 1990. Regulation of potassium fluxes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim. Biophys. Acta* 1029, 211–217.
- Ramos, J., Contreras, P., Rodriguez-Navarro, A., 1985. A potassium transport mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch. Microbiol.* 143, 88–93.
- Raths, S., Rohrer, J., Crausaz, F., Riezman, H., 1993. End3 and end4: two mutants defective in receptor-mediated and fluid-phase endocytosis in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Biol.* 120, 55–65.
- Rodriguez, C., Tejera, P., Medina, B., Guillen, R., Dominguez, A., Ramos, J., Siverio, J.M., 2010. Ure2 is involved in nitrogen catabolite repression and salt tolerance via Ca²⁺ homeostasis and calcineurin activation in the yeast *Hansenula polymorpha*. *J. Biol. Chem.* 285, 37551–37560.
- Rodriguez-Navarro, A., 2000. Potassium transport in fungi and plants. *Biochim. Biophys. Acta* 1469, 1–30.
- Sambrook, J.A.R.D.W., 2001. *Molecular Cloning: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY (pp. 6.31–6.32; 2.106–2.108).
- Santa-Maria, G.E., Rubio, F., Dubcovsky, J., Rodriguez-Navarro, A., 1997. The HAK1 gene of barley is a member of a large gene family and encodes a high-affinity potassium transporter. *Plant Cell* 9, 2281–2289.
- Saraya, R., Krikken, A.M., Kiel, J.A., Baerends, R.J., Veenhuis, M., van der Klei, I.J., 2012. Novel genetic tools for *Hansenula polymorpha*. *FEMS Yeast Res.* 12, 271–278.
- Senn, M.E., Rubio, F., Banauelos, M.A., Rodriguez-Navarro, A., 2001. Comparative functional features of plant potassium HvHAK1 and HvHAK2 transporters. *J. Biol. Chem.* 276, 44563–44569.
- Siverio, J.M., 2002. Assimilation of nitrate by yeasts. *FEMS Microbiol. Rev.* 26, 277–284.
- Springael, J.Y., Andre, B., 1998. Nitrogen-regulated ubiquitination of the Gap1 permease of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Biol. Cell* 9, 1253–1263.
- Stathopoulos, A.M., Cyert, M.S., 1997. Calcineurin acts through the CRZ1/TCN1-encoded transcription factor to regulate gene expression in yeast. *Genes Dev.* 11, 3432–3444.
- Stockmann, C., Scheidle, M., Dittrich, B., Merckelbach, A., Hehmann, G., Melmer, G., Klee, D., Buchs, J., Kang, H.A., Gellissen, G., 2009. Process development in *Hansenula polymorpha* and *Axella adenivorans*, a re-assessment. *Microb. Cell Fact.* 8, 22.
- Van der Klei, I.J., Yurimoto, H., Sakai, Y., Veenhuis, M., 2006. The significance of peroxisomes in methanol metabolism in methylotrophic yeast. *Biochim. Biophys. Acta* 1763, 1453–1462.
- Van Zutphen, T., Baerends, R.J., Susanna, K.A., de Jong, A., Kuipers, O.P., Veenhuis, M., van der Klei, I.J., 2010. Adaptation of *Hansenula polymorpha* to methanol: a transcriptome analysis. *BMC Genom.* 11, 1.
- Wang, G., Yang, J., Huijbregtse, J.M., 1999. Functional domains of the Rsp5 ubiquitin-protein ligase. *Mol. Cell. Biol.* 19, 342–352.
- Yenush, L., Mulet, J.M., Arino, J., Serrano, R., 2002. The Ppz2 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.
- Yenush, L., Merchan, S., Holmes, J., Serrano, R., 2005. PH-responsive, posttranslational regulation of the Trk1 potassium transporter by the Type 1-related Ppz1 phosphatase. *Mol. Cell. Biol.* 25, 8683–8692.