

Título: REGULACIÓN POSTRADUCCIONAL DEL TRANSPORTADOR DE NITRATO DE ALTA AFINIDAD (YNT1) DE HANSENULA POLYMORPHA. IMPLICACIONES DE LA VÍA DE LA QUINASA TOR.

Nombre: GONZÁLEZ QUIROZ, YELVIS VERÓNICA

Universidad: Universidad de La Laguna

Departamento: Bioquímica y biología molecular

Fecha de lectura: 28/02/2014

Programa de doctorado: CIENCIAS DE LA VIDA Y DEL MEDIO AMBIENTE

Dirección:

> **Director:** JOSE MANUEL SIVERIO EXPOSITO

Tribunal:

> **presidente:** ANTONIO JOSÉ MÁRQUEZ CABEZA

> **secretario:** LAILA MOUJIR MOUJIR

> **vocal:** FELIX MACHIN CONCEPCION

Descriptor:

> LEVADURAS

El fichero de tesis ya ha sido incorporado al sistema

Localización: REGULACIÓN POSTRADUCCIONAL DEL TRANSPORTADOR DE NITRATO DE ALTA AFINIDAD (YNT1) DE HANSENULA POLYMORPHA. IMPLICACIONES DE LA VÍA DE LA QUINASA TOR.

Resumen: El transportador de nitrato-nitrito de alta afinidad de la levadura *Hansenula polymorpha* (Ynt1) está regulado postraduccionalmente por la fuente de nitrógeno presente en el medio. Bajo condiciones limitantes de nitrógeno, Ynt1 se encuentra fosforilado. Esta fosforilación, dependiente de la quinasa Npr1, es importante para sus niveles y localización celular (Martin, 2008; Navarro et al., 2008). Cuando una fuente preferente de nitrógeno (por ejemplo, glutamina) es añadida al medio, Ynt1 es ubicuitinado, endocitado y degradado en la vacuola (Navarro et al., 2006). En el presente trabajo, mostramos que el ayuno de carbono también causa la degradación de Ynt1, independientemente de la presencia de nitrato. En mutantes con severas alteraciones en el tráfico intracelular y en la degradación vacuolar (Dnd4, Dpep12, Dvps27 y Dpep4), observamos mayores niveles de Ynt1 en ausencia de carbono. Cuando las células son transferidas a un medio sin fuente de carbono, Ynt1 es desfosforilado y ubicuitinado. La quimera Ynt1-GFP se acumula en la vacuola en ayuno de carbono, mientras que al interrumpir el paso hacia la vacuola se acumula en compartimentos pre-vacuolares, y su forma no-ubicuitinable permanece en la membrana plasmática. Estos resultados muestran que Ynt1 es ubicuitinado, endocitado y degradado en la vacuola en respuesta al ayuno de carbono. La introducción de múltiples copias del gen NPR1 (nNPR1), que codifica la quinasa de proteínas Npr1, trae como consecuencia un aumento en los niveles de Ynt1 que se observan en un medio sin fuente de carbono. Más aún, el ayuno de carbono induce la fosforilación de Npr1, lo que modula negativamente su actividad. Por otra parte, la adición de rapamicina afecta los niveles y localización celular de Ynt1 en ayuno de carbono, disminuyendo su desfosforilación y ubicuitinación, lo que favorece su permanencia en la membrana plasmática. La presencia de rapamicina

también inhibe la fosforilación de Npr1. Estos resultados sugieren que la vía TOR posee un rol crucial en la regulación de dichos mecanismos. Sin embargo, nuestros intentos por observar un efecto directo de la disminución de la expresión de TOR sobre Npr1 fueron infructuosos. Adicionalmente, observamos que la sustitución de los residuos Arg-86 y -363 de Ynt1 por lisina genera formas inactivas del transportador, lo que indica que estos residuos son esenciales para la actividad transportadora de Ynt1.

Por otra parte, desarrollamos vectores de expresión bajo los promotores de los genes TPS1, HAK1, HSA1 y HSA2, cuyos niveles de expresión son independientes de la fuente de nitrógeno y carbono. De esta manera, obtuvimos una cepa que expresa el gen YNT1 bajo el promotor HSA2, en la cual los niveles de expresión de YNT1 son independientes de la fuente de nitrógeno y carbono e inducibles por temperatura.

BIBLIOGRAFÍA:

Martin, Y. 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. Tesis doctoral. 2008. Dpto. de Bioquímica y Biología Molecular. Universidad de La Laguna.

Navarro, F.J., Machin, F., Martin, Y., y Siverio, J.M. (2006). Down-Regulation of Eukaryotic Nitrate Transporter by Nitrogen-Dependent Ubiquitinylation. *J. Biol. Chem.* 281, 13268-13274.

Navarro, F.J., Martin, Y., y Siverio, J.M. (2008). Phosphorylation of the Yeast Nitrate Transporter Ynt1 Is Essential for Delivery to the Plasma Membrane During Nitrogen Limitation. *J. Biol. Chem.* 283, 31208-31217.