

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA

DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA II



**Inactivación del transportador de maltosa en levadura.  
Mecanismos de su degradación.**

Memoria que para optar al grado de  
Doctora en Farmacia presenta la licenciada:

**M<sup>a</sup> Pilar Lucero Perdones.**

Directora de Tesis:

**Dra. Rosario Lagunas Gil**

Profesora de investigación.

Ponente:

**Dr. Rafael Rotger Anglada**

Profesor titular.

Rosario Lagunas Gil, Profesora de investigación del CSIC adscrita al Instituto de Investigaciones Biomédicas "Alberto Sols"

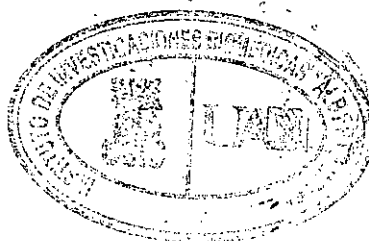
CERTIFICA:

que el trabajo titulado "Inactivación del transportador de maltosa en levadura. Mecanismos de su degradación", presentado por la licenciada en Farmacia M<sup>a</sup> Pilar Lucero Perdonés para optar al grado de Doctora en Farmacia, ha sido realizado bajo mi dirección en el Instituto de Investigaciones Biomédicas "Alberto Sols" CSIC-UAM y también que todas las contribuciones presentadas en esta memoria son producto del trabajo desarrollado por la candidata.

Y para que así conste donde proceda, firmo la presente en Madrid, a 10 de Enero de 2000



Rosario Lagunas Gil  
Profesora de Investigación.



*A mis padres*

*A David*

## ***AGRADECIMIENTOS***

## AGRADECIMIENTOS

*En primer lugar quiero expresar mi más sincero agradecimiento a la Dra. Rosario Lagunas por haberme dado la oportunidad de unirme a su grupo, por la dirección de esta tesis y por sus inestimables enseñanzas, tanto personales como científicas.*

*También agradezco sinceramente a Lali su apoyo incondicional y los buenos ratos compartidos.*

*A los Dres. J. M<sup>a</sup>. Gancedo y C. Gancedo por sus enseñanzas y críticas. A la Dra. M<sup>a</sup>. J. Mazón por su ayuda y sugerencias. A los Dres. F. Portillo y F. Eraso por estar siempre dispuestos a echar una mano.*

*Al Dr. Rotger por aceptar ser mi ponente.*

*A todos los que han formado o forman parte del grupo de levadura del IIB: Lourdes, Queti, Julian, Patrick, Miguel, M<sup>a</sup>. Jose, Victor, Mario, Oscar, Cristina, Liset, JunaMa, Edu, Élida ... por su colaboración, por las cosas compartidas, por los buenos ratos y por su amistad.*

*A Javier Pérez, Javier Merino, Antonio y Ricardo por su apoyo técnico.*

*A todos los que de una u otra forma han contribuido a la realización y escritura de esta Tesis: GRACIAS.*

*Por último una mención especial a mi familia. A mi padre y a mi madre por su constancia, su fortaleza, su apoyo y por ser un ejemplo a seguir. A mis hermanos, Pablo y Daniel, por poder contar con ellos para todo. A mi abuela, por estar siempre pendiente de mí. Y también a Dr. Soupy, por su cariño, por estar siempre a mi lado, por la muletilla "you have to be strong and go on", por hacer que todo parezca sencillo y maravilloso.*

*Este trabajo se ha realizado en el Instituto de Investigaciones Biomédicas "Alberto Sols" (CSIC-UAM). Para su desarrollo he contado con una beca del programa de Formación de Personal Investigador del M.E.C. y otra del programa "IO Framework" de la C.E.S.*

## ÍNDICE

<b>Abreviaturas.</b> .....	1
<b>RESUMEN / SUMMARY.</b> .....	3
 <b>INTRODUCCIÓN.</b>	
I. Transporte de azúcares en levadura. ....	7
II. Regulación del transporte de azúcares en levadura. ....	8
II.1. Inactivación catabólica de los transportadores. ....	9
III. Degradación de proteínas. ....	9
III.1. Mecanismos de degradación. ....	9
III.2. La vía de la ubiquitina. ....	11
III.3. Funciones de la ubiquitina. ....	13
IV. Significado fisiológico de la inactivación de los transportadores. ....	15
 <b>OBJETIVOS.</b> .....	 17
 <b>MATERIALES Y METODOS</b>	
<b>MATERIALES</b>	
1. Equipo instrumental, enzimas, isótopos y reactivos. ....	20
2. Material biológico. ....	20
2.1. Cepas de <i>S. cerevisiae</i> y <i>E. coli</i> . ....	20
2.2. Plásmidos. ....	20
2.3. Anticuerpos. ....	22
3. Medios de cultivo. ....	23
3.1. Medios de cultivo para <i>S. cerevisiae</i> . ....	23
3.2. Medios para <i>E. coli</i> . ....	23
4. Medio de inactivación. ....	23
5. Medio de endocitosis. ....	24
 <b>MÉTODOS</b>	
1. Crecimiento de las células. ....	25
2. Condiciones de inactivación. ....	25
3. Condiciones de endocitosis. ....	25
4. Obtención de extracto crudo celular por el método habitual. ....	25
5. Obtención de extracto crudo celular por el método alcalino. ....	26
6. Obtención de la fracción cruda de membranas. ....	27
7. Obtención de la fracción purificada de membrana plasmática. ....	27
8. Medida de fermentación y respiración. ....	29
9. Medida de los transportes. ....	29

9.1. Transporte de maltosa. ....	29
9.2. Transporte de galactosa. ....	30
10. Tratamiento del transportador con fosfatasa alcalina. ....	30
11. Determinación de la concentración de proteínas. ....	30
12. Determinación de la concentración intracelular de ATP. ....	31
13. Electroforesis en geles de SDS-poliacrilamida por el sistema de glicina. ....	31
14. Electroforesis en geles de SDS-poliacrilamida por el sistema de tricina. ....	33
15. Transferencia de las proteínas del gel a una membrana de nitrocelulosa o de Immobilon-P. ....	34
16. Inmunodetección. ....	35
17. Estimación del contenido de transportador de maltosa en la célula. ....	36
18. Técnicas básicas de biología molecular. ....	37
18.1. Aislamiento de DNA plasmídico de <i>E. coli</i> . ....	37
18.2. Digestión de DNA con endonucleasas de restricción. ....	37
18.3. Análisis de los fragmentos de restricción. ....	37
18.4. Extracción de DNA de geles de agarosa. ....	37
18.5. Clonaje de fragmentos de DNA. ....	37
19. Transformación celular. ....	38
19.1. Transformación de <i>E. coli</i> . ....	38
19.2 Transformación de <i>S. cerevisiae</i> . ....	38

## RESULTADOS

<b>I. Mecanismo de inactivación del transportador.</b>	<b>40</b>
I.1. Elección de las cepas de levadura. ....	41
I.2. Inactivación del transportador de maltosa en las cepas elegidas. ....	42
I.3. Idoneidad del suero inmune para detectar el transportador de maltosa. ...	44
I.4. Idoneidad del método de obtención de extractos celulares. ....	47
I.5. Puesta a punto de la determinación del contenido celular de transportador. ....	50
I.6. Variación del contenido celular de transportador durante la inactivación.	50
I.7. Correlación entre la velocidad de inactivación y de degradación del transportador. ....	53
<b>II. Papel de la vía de la ubiquitina en la endocitosis del transportador de maltosa.</b>	
II.1. Endocitosis del transportador en un mutante deficiente en la ubiquitín- proteína ligasa Npi1/Rsp5. ....	58
II.2. Endocitosis del transportador en un mutante deficiente en la ubiquitín- hidrolasa Npi2/Doa4. ....	59



<b>III. Tipo de modificación por ubiquitina que desencadena la internalización del transportador de maltosa</b>	
III.1. Obtención de un plásmido adecuado para la sobreexpresión de Ub en la cepa <i>Δdoa4</i> . .....	64
III.2. Sobreexpresión de Ub en las cepas <i>DOA4</i> y <i>Δdoa4</i> . .....	66
III.3. Efecto de la sobreexpresión de Ub en la endocitosis. ....	53
III.4. Efecto de la sobreexpresión de Ubs mutadas en las lisinas-29, -48 y -63. ....	69
III.5. Efecto de la sobreexpresión de una Ub con todas sus lisinas mutadas. ..	56
III.6. Detección del transportador unido a Ub. ....	72
<b>IV. Significado fisiológico de la inactivación catabólica de los transportadores de azúcares</b>	
IV.1. Inactivación del transportador de maltosa en presencia de glucosa, fructosa o manosa. ....	77
IV.2. Inactivación del transportador en presencia de galactosa. ....	79
IV.3. Inactivación del transportador en presencia de maltosa. ....	84
IV.4. Inactivación del transportador en presencia de etanol o en ausencia de fuente de energía. ....	84
IV.5. Correlación entre la inactivación y la degradación del transportador. ...	87
IV.6. Relación entre la velocidad de inactivación, la velocidad de fermentación y la energía producida en el catabolismo. ....	87
<b>DISCUSIÓN.</b> .....	93
<b>CONCLUSIONES.</b> .....	100
<b>BIBLIOGRAFÍA.</b> .....	102
<b>ANEXO I:</b> copia de artículos publicados. ....	112

***ANEXO I:*** abreviaturas

**ABREVIATURAS**

- ADN	Acido desoxirribonucleico.
- AMP	Adenosina-5'-monofosfato.
- ATP	Adenosina-5'-trifosfato.
- BCIP	5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato.
- bp	pares de bases.
- BSA	Seroalbúmina bovina.
- CHM	Cicloheximida.
- Ci	Curio.
- DEEB	Dietilestilbestrol.
- DMSO	Dimetil sulfóxido.
- DTE	Ditioeritritol.
- EDTA	Acido etilendiamionotetracético, sal disódica.
- IAA	Iodoacetato de sodio.
- kDa	kilodaltons.
- Lys	Lisina.
- mA	Miliamperios.
- NBT	"p-nitroblue tetrazolium chloride".
- OD	Unidad de densidad óptica.
- p/v	peso/volumen.
- PBS	Tampón fosfato salino.
- PEG-4000	Polietilenglicol 4000.
- Pi	Fosforo inorgánico.
- PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo.
- SDS	Dodecil sulfato sódico o Lauril sulfato sódico.
- Tampón AP	Tris HCl pH 9.5.
- TCA	Acido tricloroacético.
- TE	Tampón Tris-EDTA.
- TEMED	N,N,N',N'-tetrametiletildiamina.
- TMS	Segmentos transmembrana.
- Tris	Tris(hidroximetil)aminometano.
- Tween-20	Polioxietilén-sorbitán-monolaurato.
- Ub	Ubiquitina.
- UFD	"Ub fusion degradation".
- v/v	volumen/volumen.
- X-Gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil-b-galactósido.

***RESUMEN / SUMMARY***

## RESUMEN

Los transportadores de azúcares en *Saccharomyces cerevisiae* se inactivan durante el ayuno de fuente de nitrógeno cuando se halla presente glucosa. Esta inactivación, conocida en la literatura como "inactivación catabólica", es un proceso irreversible, dependiente de energía, que afecta a la  $V_{max}$  y que sigue una cinética de primer orden. Mediante el uso de anticuerpos policlonales obtenidos frente a una proteína recombinante del transportador de maltosa, hemos demostrado que la inactivación de este transportador es debida a su degradación. También en nuestro laboratorio se ha demostrado que la degradación de esta proteína tiene lugar en la vacuola tras su internalización por endocitosis. Utilizando mutantes en la vía de la ubiquitina (Ub) hemos demostrado que la Ub juega un importante papel en la endocitosis del transportador, concretamente en la etapa de internalización. Además, sobreexpresando Ubs mutadas incapaces de formar cadenas de Ub en células carentes de Ub libre, hemos demostrado que la "monoubiquitinación", definida como la unión de una molécula de Ub a una o más lisinas del transportador, es suficiente para desencadenar la máxima velocidad de internalización.

Se viene asumiendo que la "inactivación catabólica" de transportadores de azúcares distintos a los de glucosa es un mecanismo específico de regulación que favorece el uso preferencial de glucosa cuando este azúcar se halla presente en el medio. Nosotros hemos demostrado que esta inactivación no es producida específicamente por glucosa sino que otros azúcares, por ejemplo la maltosa, desencadenan y sostienen la inactivación con la misma eficacia que la glucosa. Este hecho y otros hechos observados en nuestro laboratorio sugieren fuertemente que la así llamada "inactivación catabólica" de los transportadores no es el resultado de un mecanismo específico de regulación. Proponemos que esta inactivación es debida, simplemente, a la estimulación del recambio de proteínas que provoca la carencia de fuente de nitrógeno.

## SUMMARY

Sugar transporters in *Saccharomyces cerevisiae* are inactivated during nitrogen-starvation when glucose is present. This inactivation, known as "catabolite inactivation", is an irreversible and energy-dependent process, which affects the  $V_{max}$  and follows first-order kinetics. Using polyclonal antibodies against a maltose transporter recombinant-protein, we have shown that inactivation of this transporter is due to its degradation. Also in our laboratory it has been demonstrated that degradation of this protein occurs in the vacuole after its internalization by endocytosis. Using mutants in the ubiquitin (Ub) pathway we have demonstrated that Ub plays an important role in endocytosis of the transporter, specifically in the internalization step. Moreover, by overexpressing mutated Ubs unable to form Ub chains in cells lacking free Ub, we have demonstrated that "mono-ubiquitination", defined as binding of a single Ub molecule to one or more lysine residues of the transporter, is sufficient to trigger a maximum rate of internalization.

It is believed that "catabolite inactivation" of sugar transporters other than those of glucose is a specific control mechanism which favours a preferential use of glucose when it is available in the medium. We have shown that the inactivation is not specifically produced by glucose but others sugars, i.e. maltose, trigger and support it as efficiently as glucose. These facts and others observed in our laboratory strongly suggest that the so-called "catabolite inactivation" of transporters is not the result of a specific control mechanism. We propose that this inactivation is due to the stimulation of protein turnover which is produced by the lack of a nitrogen source.

***INTRODUCCIÓN***

## INTRODUCCIÓN

### I. Transporte de azúcares en levadura.

La levadura *Saccharomyces cerevisiae* utiliza preferentemente monosacáridos como glucosa, fructosa, manosa y galactosa, y disacáridos como maltosa e isomaltosa, como fuente de carbono y de energía (76). La primera etapa de la utilización de estos azúcares es su paso a través de la membrana plasmática, estructura que define la extensión de la célula y que es permeable a moléculas no cargadas de pequeño tamaño e impermeable a moléculas cargadas y de gran tamaño. Los azúcares y la mayoría de los nutrientes no pasan libremente a través de la membrana plasmática. Por ello, su entrada en la célula requiere la acción de proteínas integrales de dicha membrana conocidas con el nombre de transportadores o permeasas. Prácticamente todas las células conocidas contienen transportadores de azúcares.

En la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, organismo unicelular eucariota, los transportadores de azúcares han sido ampliamente investigados. En este organismo se han identificado dos sistemas de transporte para monosacáridos: el de glucosa y el de galactosa. El sistema de transporte de glucosa está formado por un elevado número de proteínas capaces de transportar fructosa y manosa además de glucosa (49, 76). Estas proteínas son codificadas por genes de la familia *HXT* de la que se han identificado 20 miembros. La expresión de algunos de estos genes es constitutiva mientras que la de otros depende de la concentración de azúcar en el medio (72). El transportador de galactosa, que es capaz de transportar galactosa y, según estudios recientes también glucosa (11, 91), está codificado por el gen *GAL2* (129). La expresión de este gen es inducida por galactosa y reprimida por glucosa (24, 65, 66). El transporte de monosacáridos tiene lugar por un mecanismo de difusión facilitada (36, 107), es decir, estos azúcares son transportados a favor de gradiente de concentración y su transporte cesa cuando su concentración en la célula es igual a la del medio. Este tipo de transporte no requiere energía.

En *Saccharomyces cerevisiae* se han identificado, además, dos sistemas de transporte para disacáridos: el de maltosa y el de isomaltosa. El transportador de maltosa, que es capaz de transportar turanosa además de maltosa (15), está codificado por cinco genes situados en cada uno de los cinco loci *MAL* (*MAL1-MAL4* y *MAL6*). Todos estos locus contienen, además del gen que codifica el transportador (*MALT*), los otros dos genes que son necesarios para la utilización de maltosa: el *MALS*, que codifica la maltasa y el *MALR*, que codifica un activador de la transcripción de *MALT* y *MALS* (20). Los genes homólogos de los diferentes locus *MAL* presentan secuencias muy similares, diferenciándose únicamente en unas pocas pares de bases (17). La expresión de estos genes es inducida por maltosa y reprimida por glucosa (76).

El transportador de isomaltosa, también conocido como transportador de  $\alpha$ -metilglucósido, es capaz de transportar, además de maltosa y turanosa, isomaltosa,  $\alpha$ -



metilglucósido, maltotriosa, palatinosa y trehalosa (42). Este transportador está codificado por el gen *AGTI*, cuya secuencia presenta un 57% de identidad y un 75% de homología con los genes *MALT*. Como en el caso de estos genes, la expresión de *AGTI* es inducida por maltosa y reprimida por glucosa (42) Tanto el transporte de maltosa como el de isomaltosa actúan por un mecanismo activo de tipo simporte en el cual el azúcar es co-transportado con un  $H^+$ . Este proceso ocurre en contra de gradiente de concentración y es dependiente del gradiente electroquímico de  $H^+$  e independiente de los niveles de ATP (113).

El transporte de azúcares a través de la membrana plasmática es la primera etapa catalizada de la glicolisis, principal vía de obtención de energía en levadura, y su velocidad limita la velocidad de esta vía (25). La regulación de estos transportadores es una de las estrategias que utiliza *Saccharomyces* para adaptarse a ciertos cambios nutricionales. El hecho de que el transporte de azúcares sea el primer punto de control de la glicolisis hace particularmente interesante su estudio.

## II. Regulación del transporte de azúcares en levadura.

La captación de azúcares en levadura está regulado, al menos, por dos tipos de mecanismos, los que afectan a la actividad de los transportadores y los que afectan a su contenido. Los primeros permiten a la célula adaptarse rápida y reversiblemente a cambios ocurridos en el medio (76). Así, se sabe que determinadas condiciones fisiológicas, como el paso de aerobiosis a anaerobiosis o la carencia de fuente de nitrógeno, producen cambios rápidos y reversibles en la actividad de los transportadores (78, 79, 115) si bien, se ignora el mecanismo por el que estos cambios tienen lugar. Por el contrario, la regulación del contenido celular de los transportadores permite a la célula adaptarse a cambios medioambientales de forma relativamente lenta y duradera.

Desde hace tiempo se conocen dos mecanismos que afectan al contenido de los transportadores en la célula y que actúan a nivel transcripcional: uno reprimiendo y otro induciendo la expresión de dichas proteínas. En el caso de los transportadores de galactosa, isomaltosa y maltosa, codificados por los genes *GAL2*, *AGTI* y *MAL1T-MAL6T* respectivamente, la presencia de glucosa en el medio reprime la transcripción de estos genes mientras que, en ausencia de glucosa, la presencia del inductor correspondiente activa su transcripción y por tanto la síntesis de las proteínas correspondientes (16, 38, 66). Más recientemente se ha descrito que los transportadores de azúcares de levadura, tanto los de monosacáridos como los de disacáridos, sufren una inactivación irreversible que tiene lugar en ciertas condiciones fisiológicas. Esta inactivación es conocida como "inactivación catabólica" por analogía con la inactivación observada en el caso de ciertas proteínas citosólicas (57).

### **II.1. Inactivación catabólica de los transportadores.**

La "inactivación catabólica" se define como el proceso por el cual la actividad de determinadas proteínas disminuye al añadir glucosa a células que están en presencia de otras fuentes de carbono y energía (57). Este tipo de inactivación ha sido ampliamente estudiada en el caso de proteínas citosólicas (57). En el caso de algunas proteínas de membrana plasmática se ha visto que en presencia de glucosa, la inhibición de la síntesis de proteínas, bien por ayuno de fuente de nitrógeno bien por adición de cicloheximida, provoca su inactivación irreversible. El hecho de que tanto la inhibición del catabolismo de la glucosa como la ausencia de una fuente de energía en el medio prevengan la inactivación sugiere que este proceso es dependiente de energía (14, 25). Se ha visto también que la inactivación afecta principalmente a la  $V_{max}$  de estas proteínas y que sigue una cinética de primer orden (25, 78). Todos estos hechos sugieren que la "inactivación catabólica" de las proteínas de membrana plasmática podría ser debida a su degradación y esta posibilidad resulta muy atractiva dado que la inactivación catabólica de algunas proteínas citoplasmáticas, como la malato deshidrogenasa, fructosa-1,6-bisfosfatasa y fosfoenolpiruvato carboxikinasa, incluye su proteólisis (32, 88, 89).

### **III. Degradación de proteínas.**

La degradación de proteínas, a pesar de su aparente inconveniencia para la célula, ocurre a gran escala y cumple numerosas funciones esenciales para su supervivencia. Se sabe que la división, proliferación y diferenciación celular están controladas mediante la degradación rápida de las ciclinas (68). Así mismo, se ha visto que la proteólisis juega un papel esencial en la respuesta a las condiciones de estrés y en la adaptación de la célula a los cambios medioambientales [(53).

De estos hechos se deduce que no todas las proteínas se degradan de la misma forma en la célula sino que existen diferencias considerables en la velocidad de degradación. En *S. cerevisiae* la vida media de las proteínas, es decir, el tiempo necesario para que se degraden la mitad de sus moléculas, puede variar desde unos minutos hasta varias horas (26, 40, 62). Esto se comprende fácilmente si se tiene en cuenta las funciones tan distintas que desempeñan las proteínas. Por tanto, es evidente que su degradación tiene que ser un proceso regulado y altamente específico y el estudio de los mecanismos que lo gobiernan ha sido objeto de numerosas investigaciones.

#### **III.1. Mecanismos de degradación de proteínas.**

Se han identificado un gran número de proteinasas localizadas en los distintos compartimentos celulares de *S. cerevisiae* y también algunos de los mecanismos implicados en la degradación de proteínas citosólicas en el proteasoma (50). Sin embargo, al comienzo de este trabajo no se conocía todavía si las proteínas de membrana plasmática de levadura se degradaban en la propia membrana por la acción de proteasas específicas o

si, por el contrario y como ocurre en otros eucariotas, la degradación tenía lugar en el interior de la célula tras su internalización por endocitosis (44).

La degradación de las proteínas en el interior celular puede llevarse a cabo, al menos, por dos sistemas: el sistema vacuolar y el sistema citoplasmático independiente de la vacuola (2). El sistema vacuolar de levadura es el equivalente a la vía lisosomal de células eucariotas superiores. La vacuola se caracteriza por su pH ácido y su alto contenido en proteinasas, todas ellas muy inespecíficas. La mayoría de estas enzimas se sintetizan como precursores inactivos. Estos precursores sufren una primera modificación en el retículo endoplásmico y alcanzan la vacuola, a través del aparato de Golgi, en una forma aún no activa. Finalmente son procesados a enzimas maduros y activos en la vacuola, bien por autocatálisis bien por acción de las endoproteinasas vacuolares PrA o PrB (67). Excepcionalmente, algunas de las enzimas vacuolares son captadas por la vacuola directamente del citoplasma por un mecanismo desconocido (69). La vacuola se ha implicado en la degradación masiva de proteínas que tiene lugar en condiciones de estrés mientras que su contribución a la degradación de proteínas en células en crecimiento se cree muy pequeña (67, 126).

El sistema de degradación independiente de la vacuola es el equivalente a las vías no lisosomales de eucariotas superiores. El componente central de este sistema es el proteasoma, conocido también como complejo multicatalítico de endopeptidasas (67), que se encuentra tanto en el citoplasma como en el núcleo (104). El primer elemento que se identificó de este sistema fue el complejo 20S, que está constituido por diversas subunidades que se hallan organizadas formando un cilindro hueco. Esta estructura está altamente conservada en células eucariotas, desde levaduras hasta el hombre (104). Se ha visto que el proteasoma de levadura presenta, al menos, cinco actividades proteolíticas diferentes entre las que se encuentran actividades similares a tripsina, quimiotripsina y peptidil-glutamil-péptido hidrolasa, que catalizan la rotura de enlaces peptídicos en los que el grupo carboxilo corresponde, respectivamente, a residuos básicos, hidrofóbicos y ácidos (48). Recientemente se ha visto que el proteasoma 20S forma complejos con distintas subunidades reguladoras que modifican su actividad. Así, la unión del regulador 11S al proteasoma 20S parece estimular su actividad peptidasa pero no su actividad proteasa. Este complejo se ha implicado en la producción de péptidos antigénicos para su presentación por el complejo mayor de histocompatibilidad de clase I (104). Por otro lado, el proteasoma 20S se une al regulador 19S para formar el complejo denominado proteasoma 26S. Este proteasoma es capaz de degradar proteínas plegadas mientras que el proteasoma 20S sólo degrada proteínas desnaturalizadas, lo que sugiere que una de las actividades de la subunidad 19S es modificar la estructura de las proteínas que van a ser degradadas por este complejo (54, 97). El proteasoma 26S se ha implicado en la degradación de proteínas anormales y también en las de vida media corta como las ciclinas (62, 97). Esta

degradación puede llevarse a cabo de forma tanto dependiente como independiente de ubiquitina (Ub) (50, 97).

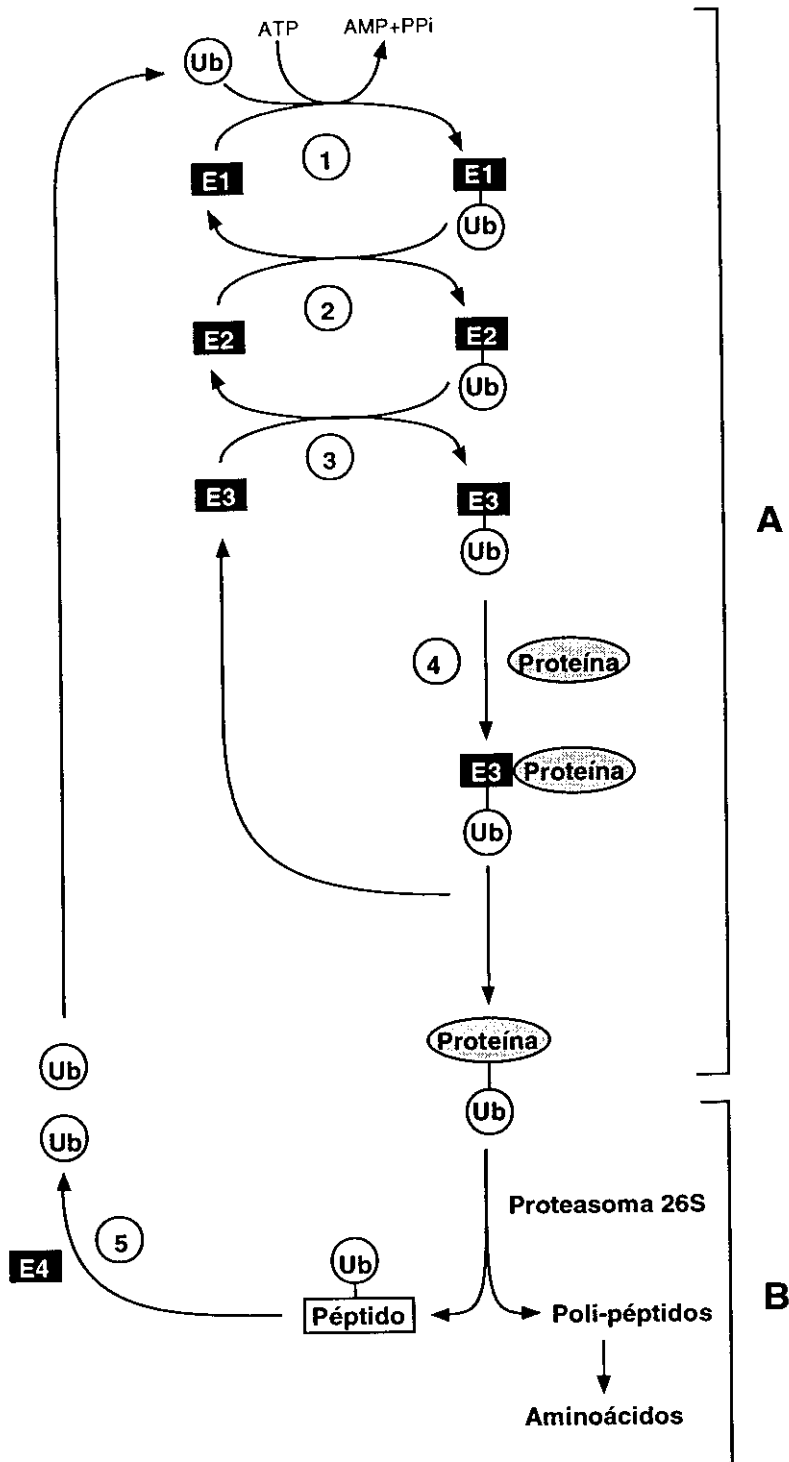
### III.2. La vía de la ubiquitina.

La Ub es un péptido de 76 aminoácidos altamente conservado que se encuentra sólo en células eucariotas (99). Este péptido se ha implicado principalmente en la degradación rápida de proteínas citosólicas en el proteasoma 26S, si bien no todas las proteínas que ligan Ub se degradan rápidamente (55). La degradación de una proteína en el proteasoma 26S por la vía de la Ub consta de dos etapas: la primera consiste en la señalización de la proteína mediante la unión covalente de una o varias moléculas de Ub (Esquema I-A), y la segunda en la degradación de la proteína conjugada a Ub. Finalmente, la Ub se recupera mediante su liberación de los péptidos resultantes, para ser usada en un nuevo ciclo de degradación (Esquema I-B).

La conjugación de Ub a la proteína sustrato requiere la acción de dos, y en algunas ocasiones tres, enzimas. Primeramente, una enzima activante de Ub (E1), en una reacción dependiente de ATP, forma un intermedio de tipo tiol-éster con el grupo carboxilo de la glicina terminal de la Ub. A continuación, la Ub así activada es transferida a una enzima conjugante de Ub (E2), a la cual queda unida por un enlace también de tipo tiol-éster. Finalmente, la Ub es transferida al grupo  $\epsilon$ -amino de determinadas lisinas de la proteína sustrato, formándose un enlace peptídico entre el grupo carboxi-terminal de la Ub y el grupo amino de la lisina. A veces, este último paso requiere la participación de una ubiquitin-proteína ligasa (E3), cuya función no está muy clara. Unos autores consideran que la función de E3 es reconocer la señal de degradación en la proteína sustrato, unirse a ella y catalizar la transferencia de Ub desde el complejo E2-Ub a la proteína sustrato [46]. Otros consideran que la función de la enzima E3 es más compleja: en primer lugar la enzima se uniría a Ub y se formaría el complejo E3-Ub, al que se uniría la proteína sustrato a través de E3. A continuación, la propia E3 catalizaría la formación del enlace peptídico entre la Ub y la proteína (99).

En la segunda etapa de la vía (Esquema I-B) la proteína es degradada por el proteasoma 26S y mediante la acción de las enzimas ubiquitín-hidrolasas o enzimas "des-ubiquitinizantes" (E4), la Ub es separada de los péptidos resultantes y recuperada en su forma libre para ser utilizada en un nuevo ciclo de degradación (54).

Se conoce una única enzima E1 cuya función es esencial para la célula. Sin embargo, se sabe que las enzimas E2, E3 y E4 son muy numerosas. Así, se han descrito hasta 13 enzimas E2 en levadura y muchas más en mamíferos. Con respecto a las E3, aunque pertenecen a una familia muy numerosa que sigue aumentando, parece improbable que exista una enzima E3 para cada uno de las diferentes proteínas sustratos. Se cree más bien que una misma enzima E3 pueda reconocer diferentes proteínas con motivos estructurales similares (22). Las enzimas E4 son también muy numerosas y engloban enzimas de dos



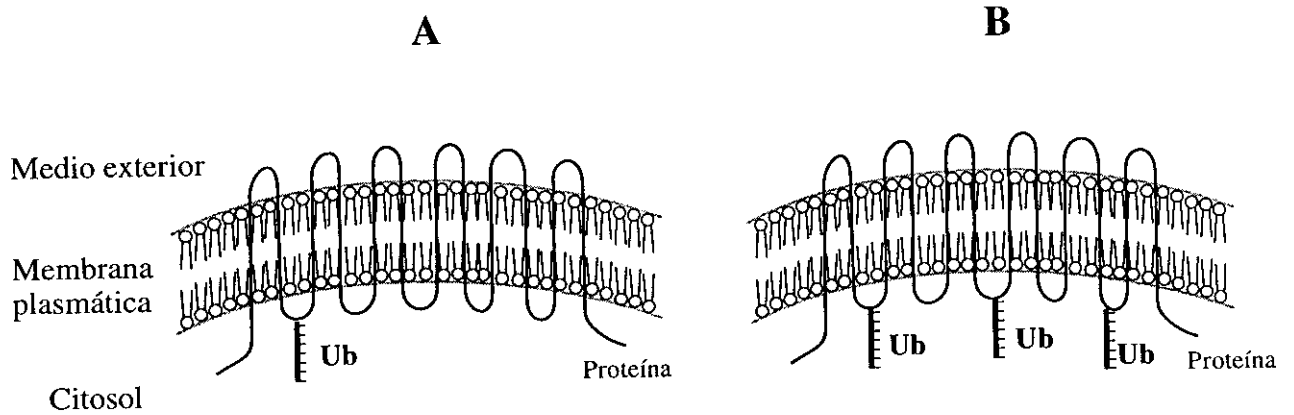
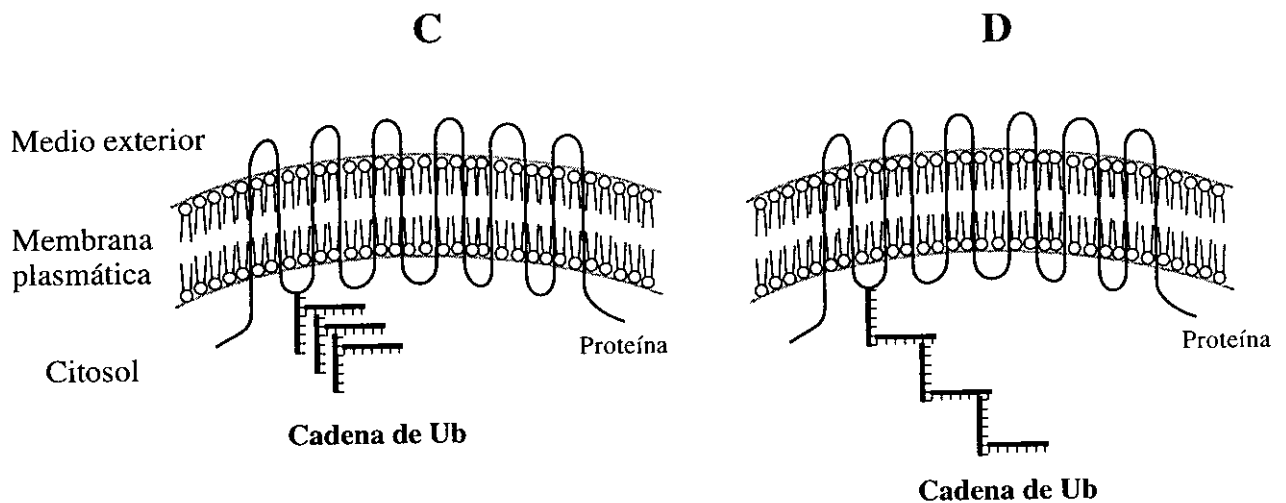
**Esquema I. La vía de la ubiquitina.** (A) Conjugación de Ub a la proteína sustrato. (1) Activación de Ub por E1. (2) Transferencia de Ub de E1 a una de las enzimas E2. (3) Transferencia de Ub de E2 a E3. (4) Formación del complejo proteína-E3-Ub y transferencia de Ub a la proteína sustrato. (B) Degradación de la proteína ubiquitinada por el proteasoma 26S. (5) Recuperación de Ub mediante la acción de las enzimas E4.

familias diferentes, ubiquitín-hidrolasas y ubiquitín-proteasas-específicas. Las primeras están implicadas en la liberación de la Ub unida a moléculas pequeñas como lisinas o péptidos. Las segundas catalizan la liberación de Ub de los complejos Ub-proteína y de cadenas libres de Ub (54, 64). Tanto en levadura como en eucariotas superiores, se ha identificado un elevado número de estas últimas enzimas, lo que sugiere que algunas de ellas podrían reconocer de forma específica distintos complejos de Ub (22).

### III.3. Funciones de la ubiquitina.

Durante bastante tiempo se pensaba que el papel más importante de la Ub era la señalización de proteínas citosólicas y, en general, de proteínas de vida media muy corta, para ser degradadas por el proteasoma 26S (54, 99). También se creía que, en el caso de las proteínas de membrana plasmática, tanto su señalización como su degradación tenía lugar por otros sistemas (109). Diversas líneas de evidencia han indicado que, como se suponía, la degradación de las proteínas de membrana plasmática tiene lugar independientemente del proteasoma, en la vacuola, tras su internalización por endocitosis (29, 87, 101, 135). Sin embargo, en el caso de la señalización se demostró durante el desarrollo de este trabajo, que la internalización de una proteína de membrana plasmática, el transportador del factor- $\alpha$  (Ste6p), es desencadenada, como en el caso de las proteínas citosólicas, por su unión a Ub (70). Posteriormente se ha obtenido evidencia, tanto en células de mamífero como en levadura, de que otras proteínas de membrana plasmática también se unen a Ub antes de ser internalizadas (29, 34, 47, 52, 70, 125).

De todo esto se deduce que la Ub puede actuar como señal para desencadenar, al menos, dos procesos diferentes: la degradación de proteínas citosólicas por el proteasoma 26S y la internalización de proteínas de membrana plasmática para su degradación en la vacuola. Este hecho plantea la pregunta de cómo estos dos sistemas de degradación, el proteasoma y la vacuola, reconocen sus respectivos sustratos. Puede ocurrir que una sola molécula de Ub se ligue por su extremo carboxilo a una lisina de la proteína sustrato. También puede ocurrir que varias moléculas de Ub se ligen de esta misma forma a varias lisinas de la proteína. Ambos tipos de modificación se conocen en la literatura como "mono-ubiquitinación" (33). Por otra parte, puesto que la Ub contiene en su secuencia 7 lisinas, puede ocurrir que a alguna de estas lisinas se ligue otra molécula de Ub. La adición sucesiva de moléculas de Ub daría lugar a la formación de cadenas (51, 54), cuya estructura variaría en función de la lisina (Lys) que interviniera en la unión Ub-Ub (1, 63). Este tipo de modificación se denomina en la literatura "poli-ubiquitinación" (12). En la Figura I se representa de forma esquemática un ejemplo de estos dos tipos de modificaciones. El hecho de que existan estas distintas posibilidades ha llevado a postular que, las diferencias en la modificación por Ub de las proteínas de citosol y de membrana

**"Mono-ubiquitinación"****"Poli-ubiquitinación"**

**Figura I. Tipos de modificaciones por Ub de proteínas de membrana plasmática.**

*"Mono-ubiquitinación"*: unión de una molécula de Ub a una (A) o más lisinas (B) de la proteína sustrato.

*"Poli-ubiquitinación"*: unión de cadenas de Ub a una o más lisinas de la proteína sustrato. La estructura de las cadenas (C y D) depende de la lisina que interviene en la unión Ub-Ub.

plasmática podrían ser responsables de su reconocimiento por sus respectivos sistemas de degradación.

Se ha visto que en *S. cerevisiae*, *in vivo*, se forman cadenas de Ub en las que intervienen la Lys-29, -48 ó -63 (31, 63, 119) y que estas cadenas están implicadas en diferentes funciones: las cadenas formadas por uniones en la Lys-29 en la denominada "vía de degradación por fusión de Ub (UFD)", cuyos sustratos fisiológicos no se conocen (63); las formadas por uniones en la Lys-63 en resistencia a estrés (1) y en reparación de ADN (119); y las formadas por uniones en la Lys-48 en el reconocimiento y degradación de proteínas citosólicas por el proteasoma (31).

En el caso de proteínas de membrana plasmática, se han descrito recientemente dos tipos de modificaciones por Ub: "mono-ubiquitinación" y "poli-ubiquitinación" con cadenas unidas por la Lys-63 (33, 127). La "mono-ubiquitinación", que como ya hemos comentado se define como la unión de una Ub a una o más lisinas de la proteína sustrato, parece ser necesaria y suficiente para desencadenar la velocidad máxima de internalización del receptor del factor- $\alpha$ , esto es, de una proteína con 7 segmentos transmembrana (7-TMS) (127). Por el contrario, se ha mostrado que la formación de cadenas unidas por la Lys-63 parece necesaria para la internalización a velocidad máxima de la uracil permeasa y el transportador general de aminoácidos (33, 122), es decir, para la internalización de dos proteínas de 12 segmentos transmembrana (12-TMS). Basándose en estos hechos, se ha postulado que los diferentes requerimientos, en lo que se refiere a Ub, para la internalización de estos dos tipos de proteínas podrían ser debidos a su diferente tamaño y número de TMS. Así, la "mono-ubiquitinación" podría ser suficiente para la interacción con la maquinaria endocítica de proteínas pequeñas como el receptor del factor- $\alpha$  (7-TMS), mientras que en el caso de proteínas grandes, como los transportadores de uracilo y de aminoácidos (12-TMS), esta interacción podría requerir su "poli-ubiquitinación" (127).

#### **IV. Significado fisiológico de la inactivación de los transportadores de azúcares.**

La levadura utiliza, como ya hemos dicho, monosacáridos y disacáridos como fuente de carbono y de energía (76). Sin embargo, consume glucosa preferentemente a cualquier otra fuente de carbono siempre que este azúcar se halla disponible en el medio. Esta utilización preferente está asegurada por distintos mecanismos de control desencadenados por la propia glucosa: inducción de la síntesis de los transportadores de glucosa (93) y represión (38) e inactivación (58) de proteínas requeridas específicamente para el catabolismo de otros sustratos. Dado que los transportadores de azúcares diferentes de los de glucosa pertenecen a este último grupo de proteínas, se viene asumiendo que la inactivación por glucosa de estos transportadores es un mecanismo de regulación para favorecer el uso preferente de este azúcar.



Esta idea de que la inactivación por glucosa de los transportadores de otros azúcares es un mecanismo de regulación se basa en dos suposiciones: i) la glucosa inactiva específicamente los transportadores de azúcares distintos de los de glucosa. ii) La inactivación de estos transportadores es producida específicamente por glucosa, otras fuentes de carbono fermentables no son capaces de producirla.

Sin embargo, resultados obtenidos tanto en nuestro laboratorio como en otros laboratorios, indican que la primera suposición no es correcta puesto que se ha visto que en las condiciones en las que tiene lugar la inactivación catabólica, esto es, en ayuno de fuente de nitrógeno, la adición de glucosa desencadena la inactivación no sólo de los transportadores de azúcares diferentes de los de glucosa, sino de todas las proteínas de membrana plasmática ensayadas: la  $H^+$ -ATPasa (7), el transportador de potasio (8, 102) la uracil permeasa (135) y todos los transportadores de azúcares ensayados (59, 101), incluso algunos de los propios transportadores de glucosa, como el Hxt6 y Hxt7 (14, 71). Sería interesante establecer si la segunda suposición es o no es correcta, es decir, investigar si la inactivación de los transportadores de azúcares es realmente producida específicamente por glucosa o si, por el contrario, otras fuentes de carbono producen una inactivación similar. Si azúcares diferentes de la glucosa inactivasen al transportador con la misma eficacia que la glucosa indicaría que, la llamada "inactivación catabólica" de los transportadores de azúcares no es, como se viene asumiendo, un mecanismo específico de regulación.

**OBJETIVOS**

## **OBJETIVOS**

Tras considerar la información disponible sobre los temas comentados, nos propusimos los siguientes objetivos:

- Establecer si la "inactivación catabólica" de los transportadores de azúcares de levadura es o no es debida a su degradación utilizando el transportador de maltosa como modelo experimental.

- En caso de que la inactivación fuera debida a degradación, establecer si requiere la vía de la Ub.

- En caso de requerir esta vía, establecer que tipo de modificación por Ub, "mono-ubiquitinación" o "poli-ubiquitinación", es necesaria.

- Establecer si la "inactivación catabólica" de los transportadores de azúcares es producida específicamente por glucosa o si, por el contrario, otras fuentes de carbono pueden ser igualmente eficaces.

***MATERIALES Y MÉTODOS***

## I. MATERIALES

### 1. Equipo instrumental, enzimas, isótopos y reactivos.

Los aparatos utilizados en la realización de este trabajo han sido los habituales en un laboratorio de microbiología.

Las enzimas de restricción y los tampones para su uso y la ADN ligasa del bacteriófago T4 procedían de Boehringer Mannheim, Pharmacia o Fermentas. La fosfatasa alcalina de intestino de ternera para fines bioquímicos procedía de Merck y la utilizada en biología molecular de New England Biolabs. La RNAsa pancreática y la lisozima procedían de Merck, la U-[<sup>14</sup>C]-maltosa y U-[<sup>14</sup>C]-galactosa de Amersham International y los inhibidores de proteasas y de fosfatasa procedían de Sigma. La acrilamida y la N'-N'-bisacrilamida procedían de Merck. El resto de los reactivos utilizados eran de grado analítico.

### 2. Material biológico.

#### 2.1. Cepas de *Saccharomyces cerevisiae* y *Escherichia coli*.

Las cepas de *S. cerevisiae* y de *E. coli* utilizadas en este trabajo y su genotipo más relevante se detallan en las Tablas I y II, respectivamente.

#### 2.2. Plásmidos.

Se utilizaron los plásmidos que se describen a continuación:

**pRM1.1.** Plásmido multicopia con resistencia a ampicilina que contiene el locus *MAL1* de *S. cerevisiae*. Este locus está formado por tres genes: *MAL11*, que codifica el transportador de maltosa; *MAL12*, que codifica la maltasa y *MAL13*, que codifica un activador de la transcripción de los otros dos genes. Además, contiene los genes *URA3* y *TRP1* de *S. cerevisiae* como marcadores de selección (105).

**pRS423.** Plásmido multicopia con resistencia a ampicilina que contiene el gen *HIS3* de *S. cerevisiae* como marcador de selección (23).

**YEp96.** Plásmido multicopia con resistencia a ampicilina que contiene un gen que codifica la Ub de levadura bajo el promotor *CUP1* que es inducible por cobre. Además, contiene el gen *TRP1* de *S. cerevisiae* como marcador de selección (28).

**YEp105.** Plásmido derivado de YEp96 que contiene un gen que codifica una Ub de levadura que lleva en su extremo amino el epítipo c-myc (10 aminoácidos de la proteína humana c-myc) (28).

**YEp96UbK29R.** Plásmido derivado de YEp96 que contiene un gen que codifica una Ub de levadura en la que la lisina en posición 29 ha sido sustituida por arginina (28).

**YEp96UbK48R** (También denominado YEp110). Plásmido derivado de YEp96 que contiene un gen que codifica una Ub de levadura en la que la lisina en posición 48 ha sido sustituida por arginina (56).

**YEp96UbK63R.** Plásmido derivado de YEp96 que contiene un gen que codifica una Ub de levadura en la que la lisina en posición 63 ha sido sustituida por arginina (33).

Tabla I. Cepas de *S. cerevisiae*.

Cepa	Genotipo	Referencia
ATCC 42407	<i>MATa suc- MAL GAL</i>	Dra. Lagunas
MAL1-1 <sup>c</sup> -D	<i>MATa leu1 trp1 MAL1R-1<sup>c</sup> (mal21 mal22 :: TRP1)</i>	Rodicio, 1986
YLP-1T	Cepa anterior transformada con el plásmido pRM1.1 descrito en Materiales.	Rodicio, 1986
X106-3D	<i>MATa gal80 his1 ura3</i>	Nevado et al, 1996
23346c	<i>MATa NP11 ura3</i>	Egner et al, 1996
27038a	<i>MATa np11 ura3</i>	Egner et al, 1996
MHY 501-pRM1.1	<i>MATα DOA4 his3-Δ200 leu2-3,112 , lys2-801 MAL11 MAL12 MAL13</i>	Papa et al, 1993
MHY 623-pRM1.1	<i>MATα doa4::LEU2 his3-Δ200 lys2-801 MAL11 MAL12 MAL13</i>	Papa et al, 1993
RH268-1c-pRM1.1	<i>MATa end4 leu2 his4 bar1-1 MAL11 MAL12 MAL13</i>	Raths et al, 1993

Tabla II. Cepas de *E. coli*.

Cepa	Genotipo	Referencia
DH5α	<i>supE44 ΔlacU169 (80 lacZΔM15) hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 relA1</i>	Sambrook et al., 1989
TG1	<i>supE hsdΔ5 thi (Δlac-proAB) F'(traD36 proAB<sup>+</sup> lac I<sup>q</sup> lacZΔM15)</i>	Sambrook et al., 1989

**YEp96UbRRR.** Plásmido derivado de YEp96 que contiene un gen que codifica una Ub de levadura en la que las lisinas en posición 29, 48 y 63 han sido sustituidas por argininas (28).

**LHp 306.** Plásmido derivado de YEp96 que codifica una ubiquitina de levadura en la que todas la lisinas, situadas en posición 6, 11, 27, 29, 33, 48 y 63, han sido sustituidas por argininas (127).

Los plásmidos generados en este trabajo que contienen genes que codifican una Ub silvestre o Ub con diferentes mutaciones se describen en la tabla III. La construcción de estos plásmidos se detalla en el esquema II (Resultados).

**Tabla III. Plásmidos que contienen genes que codifican diferentes Ubs**

Nombre del plásmido	Tipo de Ub que codifica
pLP18-Ub	Ub silvestre
pLP18-UbK29R	Ub que tiene la lisina-29 sustituida por arginina
pLP18-UbK48R	Ub que tiene la lisina-48 sustituida por arginina
pLP18-UbK63R	Ub que tiene la lisina-63 sustituida por arginina
pLP18UbRRR	Ub que tiene las lisinas-29, -48 y -63 sustituidas por argininas
pLP18-Ub-no-Lys	Ub que tiene sus 7 lisinas sustituidas por argininas
pLP2	Ub que lleva en su extremo amino el epítipo "c-myc"

### 2.3. Anticuerpos.

- *Anticuerpos policlonales (suero inmune) frente al transportador de maltosa.*

Los anticuerpos policlonales frente al transportador de maltosa fueron obtenidos por la Dra. M. Herweijer de Gist-Brocades (Delft, Holanda). Para ello, se inyectó a un conejo una proteína recombinante del transportador de maltosa obtenida expresando el plásmido pEXMPO3 en *E. coli*. Este plásmido contenía el fragmento *EcoRI-HincII* de 658 bp del gen del transportador de maltosa fusionado al gen *LacZ* del plásmido pEX-3 (124).

- *Anticuerpos policlonales (suero inmune) frente a Ub.*

Los anticuerpos utilizados para detectar Ub eran anticuerpos de conejo frente a Ub de globulos rojos de vaca conjugada a KLH. Estos anticuerpos procedían de Sigma.

- *Anticuerpos secundarios.*

Los anticuerpos secundarios utilizados en este trabajo eran anticuerpos de cabra frente a IgG de conejo y conjugados a fosfatasa alcalina o a peroxidasa. Estos anticuerpos procedían, respectivamente, de Bio-Rad y Biosource International.

### 3. Medios de cultivo.

Los medios de cultivo se esterilizaban en autoclave, en atmósfera de sobrepresión, a 121°C durante 20 minutos. Los medios sólidos se preparaban añadiendo agar-agar 1.5% concentración final.

#### 3.1. Medios de cultivo para *S. cerevisiae*.

##### 3.1.1. Medio YP.

Medio rico, utilizado para el crecimiento de levadura en el trabajo de rutina, compuesto de 1% extracto de levadura, 2% peptona y 2% glucosa o maltosa según se indica en cada experimento. Cuando la fuente de carbono era maltosa, se añadía antimicina A, un inhibidor de la respiración, que se utilizaba para forzar la fermentación de maltosa y evitar así la pérdida del plásmido pRM1.1 que contiene el locus *MALI*. Se preparaba una solución 5 mM de antimicina A en etanol que se mantenía a 4°C y de ella se añadían alícuotas al medio para una concentración final de 5 µM inmediatamente antes de inocular.

##### 3.1.2. Medio YNB

Medio mínimo comercial que contiene sulfato amónico y las sales minerales y vitaminas necesarias para el crecimiento de la levadura pero que carece de aminoácidos. Se preparaba según recomienda la casa comercial y se suplementaba con los requerimientos auxotróficos de las cepas a las concentraciones descritas en "Methods in yeast genetics" [80]. Tras ser esterilizado, se añadía la fuente de carbono indicada en cada experimento para una concentración final del 2%. La fuente de carbono se preparaba concentrada 10 veces y se esterilizaba previamente a ser usada. Cuando la fuente de carbono era maltosa, se añadía antimicina A en el momento de inocular según se ha descrito en el apartado anterior.

#### 3.2. Medios para *E. coli*.

Para el crecimiento de este microorganismo se utilizaba el medio LB (Luria Broth) que contiene 10 g/l de bacto-triptona, 5 g/l de extracto de levadura y 10 g/l de NaCl. La solución se ajustaba a pH 7.5 con NaOH y se esterilizaba en autoclave. Cuando se crecían bacterias transformadas con plásmidos que contenían el gen de resistencia a ampicilina, se añadía ampicilina a una concentración final de 50 µg/ml. La ampicilina se preparaba concentrada 1000 veces, se mantenía a -20°C y se añadía al medio en el momento de ser inoculado.

### 4. Medio de inactivación

Este medio carecía de fuente de nitrógeno y se preparaba con agua MilliQ. Su composición, referida a un litro, era la siguiente:



- Sales minerales y oligoelementos:  $K_2PO_4H$  5.92 g;  $KPO_4H_2$  0.2g;  $H_3PO_4$  al 85% 1.7 ml; KCL 9 mg; NaCL 0.25 g;  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.25 g;  $FeCl_2$  1 mg;  $SO_4Zn$  1.8 mg;  $CuSO_4$  0.1mg. Esta solución se ajustaba a pH 6.0 con KOH y se esterilizaba en autoclave. Un vez fría se añadían, en esterilidad, las vitaminas y la fuente de energía, al 2%, adecuada para el experimento.

- Vitaminas: Biotina 0.02g; D-pantotenato cálcico 0.5mg; Inositol 10 mg; Tiamina 4 mg; Piridoxina 1mg. Las vitaminas, que se preparaban concentradas 1000 veces, se esterilizaban por filtración a través de un filtro Renner GmbH de 0,2  $\mu m$  de tamaño de poro y se conservaban a 4°C.

- Fuente de energía: cuando se utilizaban azúcares, se preparaba una solución al 20% que se esterilizaba en autoclave. Se añadía para concentración final del 2% en el momento de iniciar el experimento. En el caso del etanol se utilizaba el producto comercial y se añadía también para una concentración final del 2% en el momento de iniciar el experimento

### **5. Medio de endocitosis.**

La composición de este medio era la misma que la del medio de inactivación pero, en este caso, la fuente de energía era glucosa.

## **II. MÉTODOS**

### **1. Crecimiento de las células.**

Las cepas de *S. cerevisiae* y de *E. coli* se conservaban a -70°C suspendidas en glicerol al 15 y 20% (p/v), respectivamente. Las de uso frecuente se mantenían a 4°C en placas petri crecidas en el medio sólido adecuado en cada caso. El cultivo en medio líquido se realizaba en matraces cuya capacidad era al menos 5 veces el volumen del medio de cultivo que contenían. Con ello se aseguraba una buena aireación. La incubación de *S. cerevisiae* y *E. coli* se realizaba, respectivamente, a 30 y 37°C con agitación vigorosa (200-250 rpm). El cultivo en medio sólido se realizaba en placas petri que se incubaban a las temperaturas indicadas. El crecimiento celular se seguía midiendo la turbidez del cultivo a 640 nm en un espectrofotómetro Hitachi 100-10. En base a curvas de calibración previamente obtenidas, se consideraba que 1 ml de un cultivo de levadura de una absorbancia de 1 unidad de densidad óptica (OD) correspondía a 0.29 mg proteína. Para detectar posibles contaminaciones bacterianas, los cultivos se examinaban al microscopio óptico.

### **2. Condiciones de inactivación.**

Para desencadenar la inactivación de los transportadores de azúcares se ayunaba a las células de fuente de nitrógeno. Para ello, células creciendo exponencialmente se recogían por centrifugación a 5000 rpm durante 3 minutos. Se lavaban con agua milliQ, se suspendían en un volumen de medio de inactivación (Materiales) 3 veces superior al volumen inicial de cultivo, para evitar que se agotasen los nutrientes durante el experimento, y se añadía la fuente de energía que se indica en cada experimento. La suspensión se incubaba a 30°C con agitación (180-200 rpm).

Para evitar contaminaciones bacterianas durante las manipulaciones se añadía a la suspensión 250-500 µg/ml clorhidrato de tetraciclina concentración final.

### **3. Condiciones de endocitosis.**

La endocitosis del transportador de maltosa se desencadenaba ayunando a las células de fuente de nitrógeno. Para ello, las células se recogían, se suspendían en el medio de endocitosis (Materiales) y se incubaban como se ha descrito más arriba.

Para evitar contaminaciones bacterianas durante las manipulaciones se añadía a la suspensión 250-500 µg/ml clorhidrato de tetraciclina concentración final.

### **4. Obtención de extracto crudo celular por el método habitual.**

Se utilizó el método desarrollado por Serrano (1983) (114) ligeramente modificado.

#### **4. 1. Soluciones empleadas.**

- Tampón de rotura de células:

DTE 2 mM

EDTA 5 mM

Tris-HCl 50 mM pH 8.5

- Solución de lavado:
  - DTE 0.5 mM
  - EDTA 0.5 mM
  - Tris-HCl 50 mM pH 8.0

- Solución GTED:
  - DTE 0.1 mM
  - EDTA 0.1 mM
  - Glicerol al 20% (v/v)
  - Tricina-tris 10 mM pH 7.5

Estas tres soluciones se conservaban a 4°C.

- Inhibidores de proteasas:

Se preparaban soluciones stock conteniendo PMSF 0.1 M en etanol, IAA 0.1M, chimostatina 2.5 mg/ml en DMSO y leupeptina 1 mg/ml, que se conservaban a -20°C. De estas soluciones se tomaban alícuotas para alcanzar las concentraciones deseadas en cada caso.

#### **4.2. Procedimiento.**

Un volumen del cultivo de levadura correspondiente a, aproximadamente, 125 mg de proteína se centrifugaba a 3000-4000 rpm durante 5 minutos. Las células se suspendían en 50 ml de agua destilada, se transferían a un tubo picudo de plástico de 50 ml de capacidad y se centrifugaban en las condiciones descritas más arriba. Se retiraba el sobrenadante y se añadían 4 ml de tampón de rotura frío, PMSF 1 mM concentración final y 8 ml de bolas de vidrio de 0.5 mm de diámetro previamente enfriadas. En algunos experimentos, además de PMSF se añadía IAA 1 mM, chimostatina 25 µg/ml y leupeptina 10 µg/ml concentración final. Se agitaba en vortex durante un minuto y se dejaba enfriar en hielo durante otro minuto. Este proceso se repetía 5 veces. Se recogía el sobrenadante con una pipeta pasteur y las bolas se lavaban 3 veces con 4 ml de la solución de lavado en presencia de PMSF 1 mM y, cuando era necesario, del resto de los inhibidores. Los líquidos de lavado se reunían con el sobrenadante y se centrifugaba a 4°C a 3000 rpm el rotor JA-20 en una centrifuga Beckman J2-21 durante 10 minutos. El sobrenadante constituía el extracto crudo celular que se conservaba en alícuotas a -70°C hasta su análisis.

### **5. Obtención de extracto crudo celular por el método alcalino.**

Se siguió el método descrito en Silve (1991) (118) con alguna modificación.

#### **5.1. Soluciones empleadas.**

- Solución de rotura de células:

NaOH 1.85 M

Mercaptoetanol 2%

Esta solución se conservaba a -20°C

- Solución Laemmli (conservada a -20°C):

Tris-HCl 62.5 mM pH6.8

SDS 2%

DTE 20 mM

EDTA 2 mM

Sacarosa 10%

Azul de bromofenol 0.1 mg/ml

- Solución Tris 1M

## 5.2. Procedimiento.

Un volumen del cultivo de levadura correspondiente a, aproximadamente, 1 mg de proteína se centrifugaba a 3000 rpm durante 5 minutos. Las células se suspendían en 1 ml de agua destilada, se transferían a un eppendorf de 1.5 ml de capacidad y se centrifugaban durante 2 minutos a 12000 rpm en una microcentrífuga. El pellet se suspendía en 0.250 ml de la solución de rotura y se dejaba 10 minutos en hielo. Transcurrido este tiempo, se añadían 0.250 ml de TCA 50%, se dejaba otros 10 minutos en hielo para que precipitasen las proteínas y se centrifugaba durante 10 minutos a 12000 rpm. El pellet se lavaba 2 veces con 1 ml de agua fría y se suspendía en 0.250 ml de la solución de Laemmli descrita más arriba. Se calentaba durante 10 minutos a 37°C y se aplicaba en el gel de SDS-poliacrilamida .

## 6. Obtención de la fracción cruda de membranas.

### 6.1. Soluciones empleadas.

- Solución GTED:

DTE 0.1 mM

EDTA 0.1 mM

Glicerol al 20% (v/v)

Tricina-tris 10 mM pH 7.5

Estas solución se conservaba a 4°C.

- Solución de PMSF 0.1M en etanol. Conservado a -20°C.

### 6.2. Procedimiento.

La fracción cruda de membranas se obtenía a partir del extracto crudo celular obtenido como se describe en Métodos 4. Para ello, el extracto crudo se centrifugaba a 4°C a 30000 rpm durante 30 minutos en el rotor 60Ti en una ultracentrífuga Beckman L8-55. El pellet obtenido se suspendía en 1.5 ml de la solución GTED añadida de 1 mM PMSF y se homogeneizaba en un homogenizador manual de vidrio esmerilado previamente enfriado. La suspensión obtenida constituía la fracción cruda de membranas que se conservaba en alícuotas a -70°C hasta su análisis.

## 7. Obtención de la fracción purificada de membrana plasmática.

### 7.1. Soluciones empleadas.

- Solución GTED, descrita en el apartado anterior.

- Solución de sacarosa al 53.5%
  - Sacarosa al 53.5%
  - DTE 0.1 mM
  - EDTA 0.1 mM
  - Tricina-tris 10 mM pH 7.5
- Solución de sacarosa al 43.5%
  - Sacarosa al 43.5%
  - DTE 0.1 mM
  - EDTA 0.1 mM
  - Tricina-Tris 10 mM pH 7.5

Las concentraciones de sacarosa se ajustaban utilizando un refractómetro y se conservaban a -20°C.

- Solución PMSF 0.1 M en etanol conservada a -20°C.

## 7.2. Procedimiento.

Se preparaba un gradiente discontinuo de sacarosa en un tubo del rotor SW-60 en el que se depositaban 0.7 ml de la solución de sacarosa al 53.5% y a continuación, dejando resbalar por las paredes, 1.4 ml de la solución de sacarosa al 43.5%. A este gradiente se aplicaba cuidadosamente la fracción cruda de membranas obtenida como se describe más arriba. Se centrifugaba a 4°C a 55000 rpm durante 3 horas, en una ultracentrífuga Beckman L8-553 en un rotor SW60 y, transcurrido este periodo, se dejaba detener el rotor sin utilizar el freno. Tras la centrifugación se distinguían ópticamente 4 zonas en el gradiente:

- 1) Parte superior, de aspecto blanquecino constituida por material graso suspendido en la solución GTED de la muestra.
- 2) Banda situada en la interfase GTED/sacarosa al 43.5% que contiene la membrana mitocondrial.
- 3) Banda situada en la interfase sacarosa al 43.5%/sacarosa al 53.5% que contiene la membrana plasmática.
- 4) Sedimento que contiene los componentes de mayor densidad de la célula, como ácidos nucleicos y polisacáridos.

Después de eliminar la banda de la membrana mitocondrial y la solución de sacarosa al 43.5% por aspiración a vacío con una pipeta Pasteur, se recogía muy cuidadosamente la banda correspondiente a la membrana plasmática. Se diluía con 3 volúmenes de agua destilada fría, se mezclaba y se centrifugaba a 4°C a 40000 rpm en el rotor 50Ti en una ultracentrífuga Beckman L8-55 durante 30 minutos. El pellet se suspendía en 1 ml de la solución GTED añadida de 1mM PMSF y se homogeneizaba. El homogeneizado constituía la fracción purificada de membrana plasmática que se conservaba en alícuotas a -70°C hasta su análisis.

## 8. Medida de fermentación y respiración.

La fermentación y respiración se midieron siguiendo la producción de CO<sub>2</sub> y consumo de O<sub>2</sub>, respectivamente, en un respirómetro de Warburg siguiendo las técnicas convencionales (130). Las células se recogían durante el crecimiento exponencial, se lavaban con agua y se suspendían en medio YP o en medio de inactivación conteniendo el azúcar a ensayar. Alícuotas de 1 ml de esta suspensión se depositaban en matraces del respirómetro de 15 ml de capacidad, que se sumergían en el baño previamente calentado a 30°C. Los matraces se mantenían en agitación durante todo el experimento. Antes de comenzar las lecturas manométricas se atemperaban las suspensiones celulares durante 15 minutos. En cada experimento se llevaba en paralelo un matraz sin células con el fin de corregir las posibles oscilaciones de los barómetros debidas a cambios de temperatura o de presión atmosférica. Los cambios de presión en los manómetros se medían cada 10 minutos durante 3-6 horas.

## 9. Medida de los transportes.

### 9.1. Transporte de maltosa.

Se siguió el método descrito por Serrano (1977) (113) con alguna modificación.

#### 9.1.1. Soluciones empleadas.

- Acido tartárico 0.1 M pH 4.2. Se conservaba a 4°C.
- U- [<sup>14</sup>C] maltosa 45 mM (0.5 μCi/μmol).
- Líquido de centelleo Optiphase "HiSafe2".

#### 9.1.2. Ensayo.

Un volumen del cultivo de levadura correspondiente a 5 mg de proteína se centrifugaba en tubos cónicos en una centrífuga de mesa. Las células se lavaban con 10 ml de ácido tartárico 0.1 M pH 4.2 y se resuspendían en 0.25 ml de la misma solución. La suspensión de células se incubaba a 20°C durante 3 minutos. El transporte se iniciaba depositando 50 μl de la suspensión de células en un tubo cónico que contenía 5 μl de la solución de maltosa radioactiva. Transcurridos 15 segundos de incubación a 20°C, la reacción se detenía añadiendo 10 ml de agua a 4°C. Inmediatamente, la suspensión se filtraba a vacío a través de un filtro de fibra de vidrio GF/C y las células fijadas al filtro se lavaban con otros 10 ml de agua fría. El filtro se introducía rápidamente en viales que contenían 3 ml del líquido de centelleo. Pasados 30 minutos, la radioactividad se contaba en un contador de centelleo durante 1 minuto.

Para medir la adsorción inespecífica de maltosa radiactiva a las células o al filtro, se suspendía una alícuota de 50 μl de la suspensión de la levadura en 5 ml de agua previamente calentada a baño maría. Se dejaba hervir durante 5 minutos y se enfriaba en hielo. Se añadía 5 ml de agua fría y 5 μl de la solución de maltosa radioactiva, se filtraba inmediatamente y se seguía el mismo tratamiento que en la medida del transporte. Los valores obtenidos se restaban de los de la medida del transporte.

Para conocer la relación entre la radioactividad y la concentración de maltosa, 50 μl de la solución de maltosa radiactiva diluida 1/100 se depositaban sobre un filtro húmedo que se

introducía inmediatamente en el vial con el líquido de centelleo. La radiactividad se contaba como en los casos anteriores.

## **9.2. Transporte de galactosa.**

Se siguió el método descrito por De Juan (1986) (25) con alguna modificación.

### **9.2.1. Soluciones empleadas.**

- $\text{KH}_2\text{PO}_4$  50mM pH 6. Se conservaba a 4°C.
- U- [ $^{14}\text{C}$ ] galactosa 55mM (0.4  $\mu\text{Ci}/\mu\text{mol}$ ).
- Líquido de centelleo Optiphase "HiSafe2".

### **9.2.2. Ensayo.**

Para medir el transporte de galactosa se seguía el mismo procedimiento que en el caso del transporte de maltosa excepto que, en vez de utilizar ácido tartárico 0.1M pH 4.2 se utilizaba  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  50 mM pH 6.

## **10. Tratamiento del transportador con fosfatasa alcalina.**

### **10.1. Soluciones empleadas.**

- Tris-HCl 100 mM pH 8.0,  $\text{MgCl}_2$  1 mM,  $\text{ZnSO}_4$  0.1 mM.
- SDS 20%
- Fosfatasa alcalina.
- Inhibidores de proteasas como se describe en Métodos 4.

### **10.2. Ensayo.**

El tratamiento con fosfatasa alcalina se realizó en muestras de fracción purificada de membrana plasmática. Alícuotas correspondientes a 200  $\mu\text{g}$  de proteína se centrifugaban a 4°C a 12000 rpm en una microfuga durante 10 minutos. El pellet se suspendía en 20  $\mu\text{l}$  de un tampón que contenía Tris-HCl 100 mM pH 8.0,  $\text{MgCl}_2$  1 mM y  $\text{ZnSO}_4$  0.1 mM, se añadían 5  $\mu\text{l}$  de SDS 20% y se calentaba a 42°C durante 15 minutos. A continuación, se añadían 200  $\mu\text{l}$  del mismo tampón con el fin de diluir el SDS, se dividía el volumen final en dos alícuotas iguales y, a una de ellas, se añadían 5  $\mu\text{l}$  de fosfatasa alcalina. Ambas alícuotas se incubaban a 37°C durante 1 hora. Para evitar la degradación del transportador durante la última incubación, se añadían los inhibidores de proteasas a las concentraciones indicadas en Métodos 4. Terminado el tratamiento con la fosfatasa, las muestras se trataban según se indica en Métodos 13.

## **11. Determinación de la concentración de proteínas.**

La determinación del contenido de proteína se realizaba por el método de Lowry (1951) (80) previa precipitación con TCA. Para ello, se tomaba una alícuota de la muestra a ensayar, se añadía TCA para una concentración final del 5% y se incubaba en hielo 10 minutos. Se centrifugaba 5 minutos a 12000 rpm en una microfuga, se eliminaba el sobrenadante exhaustivamente y el precipitado se disolvía en NaOH 1 N. Para facilitar su solubilización se calentaba unos minutos al baño maría. Una vez disuelta la proteína se procedía a su valoración siguiendo el método de Lowry

[84]. La estimación de la concentración de proteína se realizaba a partir de una curva de calibración obtenida, para cada ensayo, utilizando una solución de BSA 1 mg/ml tratada igual y simultáneamente que las muestras problemas.

## 12. Determinación de la concentración intracelular de ATP.

Para determinar el contenido intracelular de ATP, las células se recogían siguiendo el método de filtración rápida descrito en (110) y se sumergían en nitrógeno líquido. Tras su extracción con ácido perclórico (110), el ATP contenido en el extracto se medía enzimáticamente utilizando fosfoglicerato kinasa como se describe en (61).

## 13. Electroforesis en geles de SDS-poliacrilamida por el sistema de glicina.

### 13.1. Soluciones empleadas.

- Solución de acrilamida: acrilamida 38% (p/v), bisacrilamida 2% (p/v). Esta solución se filtraba a vacío a través de filtros de nitrocelulosa de 0.45  $\mu\text{m}$  de tamaño de poro y se conservaba a 4°C. Se manejaba siempre con guantes.

- Tampón de separación. Se preparaba concentrado dos veces y se mantenía a 4°C. Se utilizaba a la siguiente concentración:

Tris-HCl 0.75 M pH 8.8

SDS 0.2 %

- Tampón de empaquetamiento. Se preparaba concentrado dos veces y se mantenía a 4°C. Se utilizaba a la siguiente concentración:

Tris-HCl 0.25 M pH 6.8

SDS 0.2%

- Persulfato amónico al 10%. Se mantenía congelado a -20°C en alícuotas.

- TEMED 6.6 M. Se guardaba a 4°C.

- Tampón de desarrollo de electroforesis. Se preparaba concentrado 10 veces y se mantenía a 4°C. Se utilizaba a la siguiente concentración:

Glicina 0.19 M

Tris-base hasta obtener pH 8.3

SDS 0.1 %

- Isobutanol saturado con agua.

- Solución Laemmli:

Tris-HCl 62.5 mM pH 6.8

SDS 2%

DTE 20 mM

EDTA 2 mM

Sacarosa 10%

Azul de bromofenol 0.1 mg/ml

Esta solución se conservaba a -20°C.



### 13.2. Preparación de los geles.

Se utilizó el método de Laemmli modificado (74). Utilizamos geles de SDS-poliacrilamida al 10% de 1 mm de espesor que preparábamos entre dos placas de cristal de 9 x 9.5 cm o de 16 x 16 cm. Antes de montar el sistema, las placas se limpiaban con etanol para eliminar posibles restos de detergente o grasa. Los laterales de las placas se sellaban con tiras de teflón y la base con una tira de papel whatman 3MM doblada, con un ancho final de aproximadamente 0.5 cm. Todo ello se sujetaba con pinzas. El gel separador se preparaba, en el caso de geles de 9 x 9.5 cm, con 1.875 ml de la solución de acrilamida/bisacrilamida, 3.75 ml del tampón de separación, 1.725 ml de agua y 75 µl de persulfato amónico al 10%. Para sellar la base de las placas, se tomaban 0.75 ml de esta solución, se añadían 7 µl de TEMED y se vertía inmediatamente entre las dos placas. Se dejaba polimerizar durante 2-3 minutos. Transcurrido este tiempo, se añadían 7 µl de TEMED al resto de la mezcla y se vertía entre las placas. Para obtener una superficie lisa y horizontal, se añadía cuidadosamente 0.5 ml de isobutanol saturado con agua y se dejaba polimerizar el gel durante 30 minutos. Una vez polimerizado, se retiraba el isobutanol y se lavaba el espacio entre las placas con agua. Los restos de agua se eliminaban cuidadosamente con ayuda de un papel de filtro.

A continuación, se preparaba el gel concentrador. En el caso de geles de 9 x 9.5 cm, se preparaba una mezcla con 0.225 ml de la solución de acrilamida/bisacrilamida, 1.5 ml del tampón de empaquetamiento, 1.21 ml de agua, 30 µl de persulfato amónico al 10% y 6 µl de TEMED. Esta mezcla se depositaba sobre el gel separador e inmediatamente se introducía un peine de teflón con pocillos de aproximadamente 4 x 1 mm de base. El gel concentrador se dejaba polimerizar al menos 1 hora. Si el tamaño de las placas era mayor se preparaba la cantidad de gel separador y concentrador necesario manteniendo estas mismas proporciones.

### 13.3. Preparación de las muestras para la electroforesis.

Alícuotas conteniendo la cantidad de proteína requerida para el experimento, normalmente 100-200 µg, se completaban con agua hasta 100 µl y se añadía TCA frío para una concentración final del 10%. Se dejaba precipitar en hielo durante 10 minutos y se centrifugaba a 12000 rpm en microcentrífuga durante 15 minutos a 4°C. El pellet se lavaba con 1 ml de agua fría y suspendía en 50-100 µl de la solución Laemmli descrita más arriba. Las muestras se calentaban a 42°C durante 15-20 minutos, hasta que la proteína se disolvía totalmente.

Se utilizaron proteínas marcadoras de peso molecular sin preteñir cuyos pesos moleculares oscilaban entre 200 y 45 kDa. Estos marcadores se prepararon siguiendo las instrucciones de la casa comercial.

### 13.4. Desarrollo de la electroforesis.

El desarrollo de la electroforesis se realizaba en cubetas de electroforesis vertical. Una vez llenos los reservorios de la cubeta con el tampón de desarrollo de electroforesis, se quitaba el peine y se aplicaban las muestras con ayuda de una jeringa Hamilton. En estos geles, la máxima cantidad

de proteína que se aconseja aplicar por pocillo es de 1-10  $\mu\text{g}$  por  $\text{mm}^2$  de sección del pocillo. El desarrollo de la electroforesis en las placas de 9 x 9.5 cm se realizaba a 50-80 voltios hasta que las muestras penetraban en el gel separador y después a 120-140 voltios. La electroforesis completa duraba unas 3 horas. En el caso de las placas de 16 x 16 cm, se aplicaba un voltaje de 30 voltios durante 19-20 horas o bien, una vez las muestras habían penetrado en el gel separador, se aplicaba un voltaje de 200-250 voltios durante 5-6 horas.

Terminada la electroforesis, las proteínas retenidas en el gel se transferían a una membrana de nitrocelulosa como se describe en Métodos 15.

#### **14. Electroforesis en geles de SDS-poliacrilamida por el sistema de tricina.**

Este sistema de electroforesis se utilizó únicamente cuando se quería detectar Ub.

##### **14.1. Soluciones empleadas.**

Las soluciones empleadas para este tipo de electroforesis eran las mismas que las utilizadas en el caso de electroforesis por el sistema de glicina, excepto las soluciones que se describen a continuación.

- Tampón para la preparación del gel: Tris-HCl 3 M pH 8.45. Para disolver el Tris es necesario calentar la solución. El pH se ajustaba cuando la solución se había enfriado.

- Tampón de desarrollo de electroforesis:

  - Tampón para el ánodo: Tris HCl 0.2 M pH 8.9

  - Tampón para el cátodo: Tris 0.1 M, Tricina 0.1 M. El pH de esta solución debía ser aproximadamente 8.25.

Estos dos tampones se preparaban concentrados cinco veces y se mantenían a 4°C.

##### **14.2. Preparación de los geles.**

Se siguió el método descrito en Schagger, H. and von Jagow, G. (1987) (112).

Utilizamos geles de 1mm de espesor que se preparaban entre dos placas de cristal de 9 x 9.5 cm. El montaje de las placas y la preparación de los geles se realizó de la forma descrita en Métodos 13.

El gel separador se preparaba con 2.95 ml de la solución de acrilamida/bisacrilamida, 2.5 ml de glicerol 40%, 2.5 ml del tampón de preparación de gel, 75  $\mu\text{l}$  de SDS al 10%, 35  $\mu\text{l}$  de persulfato amónico al 10% y 3.5  $\mu\text{l}$  de TEMED. El gel concentrador se preparaba con 270  $\mu\text{l}$  de la solución de acrilamida/bisacrilamida, 1.92 ml de agua, 750  $\mu\text{l}$  del tampón de preparación de gel, 30  $\mu\text{l}$  de SDS al 10%, 23  $\mu\text{l}$  persulfato amónico al 10% y 2.5  $\mu\text{l}$  de TEMED.

##### **14.3. Preparación de las muestras para la electroforesis.**

Alícuotas conteniendo 50  $\mu\text{g}$  de proteína se completaban con agua hasta 25  $\mu\text{l}$  y se añadía 25  $\mu\text{l}$  de una solución Laemmli (Materiales 13) que se había preparado concentrada dos veces. Las muestras se calentaban a 95°C durante 5 minutos.

En el caso de de la Ub comercial, una alícuota de 1 µg se disolvía en 10 µl de agua, se añadían 10 µl de la solución de Laemmli concentrada dos veces y se calentaba a 95°C durante 5 minutos.

#### **14.4. Desarrollo de la electroforesis.**

El desarrollo de la electroforesis se realizaba también en cubetas de electroforesis verticales. Una vez llenos los reservorios de la cubeta, el superior con el tampón para el cátodo y el inferior con el tampón para el ánodo, se aplicaban las muestras y se desarrollaba la electroforesis como se describe en Métodos 13.

Terminada la electroforesis, las proteínas retenidas en el gel se transferían a una membrana de Immobilon-P.

### **15. Transferencia de las proteínas del gel a una membrana de nitrocelulosa o de Immobilon-P.**

#### **15.1. Soluciones empleadas.**

- Tampón de transferencia:

Tris-base 25 mM

Glicina 0.19 M

Metanol 20%

Se preparaba una solución concentrada 10 veces que contenía la glicina y el Tris. EL pH de esta solución debía estar entre 8.6 y 8.8. Esta solución se conservaba a 4°C y se diluía con agua y metanol en el momento de ser utilizada.

- Solución de tinción del gel:

Acético 10%

Metanol 50%

Coomassie Brilliant Blue R-250 0.05%.

- Solución de desteñir geles:

Acético 10%

Metanol 20%

- Solución de Ponceau'S:

Ponceau'S 0.1% (p/v)

Acético 5% (v/v)

- Acético 1%

- Glicerol 3% (v/v)

Las últimas soluciones se conservaban a temperatura ambiente.

#### **15.2. Procedimiento.**

La transferencia se realizaba en un transferidor con electrodos de grafito de Pharmacia LKB. Sobre el electrodo positivo se colocaban 3 papeles Whatman 3MM, la membrana de nitrocelulosa

(0.45  $\mu\text{m}$  de tamaño de poro, de Millipore) o de Immobilon-P (de Millipore), el gel de poliacrilamida y otros 3 papeles Whatman 3MM. Los papeles Whatman y la membrana, del mismo tamaño que el gel, se humedecían previamente en el tampón de transferencia. La presencia de burbujas de aire entre las distintas capas impide el paso de la corriente eléctrica y por tanto la transferencia de las proteínas. Para eliminarlas, se deslizaba una varilla de vidrio humedecida en el tampón de transferencia. Finalmente, se colocaba el electrodo negativo y se aplicaba una corriente continua de 2-2.5 mA por  $\text{cm}^2$  de superficie de gel durante 1.5 horas.

Para comprobar la eficacia de la transferencia, la membrana de nitrocelulosa se sumergía en la solución Ponceau's durante 1-2 minutos para visualizar las proteínas. Tras eliminar el exceso de colorante lavando con acético al 1%, se señalaba la posición de los marcadores de peso molecular y se procedía a la inmunodetección del transportador de maltosa. Por otro lado, el gel se sumergía en la solución de tinción de geles. Una vez teñidas las proteínas, el exceso de colorante se eliminaba lavando el gel con la solución de desteñir geles. Cuando se diferenciaban claramente las bandas de las proteínas, el gel se introducía en una solución de glicerol al 3 % (v/v) durante 2-3 horas y se secaba en un secageles a  $80^\circ\text{C}$  durante 45 minutos.

## 16. Inmunodetección.

### 16.1. Soluciones empleadas.

- Tampón PBS. Se preparaba concentrado 10 veces y se mantenía a temperatura ambiente.

Se usaba a la siguiente concentración:

NaCl 1.4 M

KCl 2.7 mM

$\text{KPO}_4\text{H}_2$  1.5 mM

$\text{Na}_2\text{PO}_4\text{H}$  8.1 mM.

- Solución de lavado: Tween-20 al 0.1% disuelto en tampón PBS. Se preparaba una solución de Tween-20 al 20% (v/v) que se conservaba estéril a  $4^\circ\text{C}$ . La solución de lavado se preparaba en el momento de usarla diluyendo la solución de Tween-20 con PBS.

- Solución de bloqueo: leche en polvo al 5% en solución de lavado. Se preparaba en el momento de usarla.

- Tampón AP: Tris-HCl 0.1 M pH 9.5. Se conservaba a temperatura ambiente.

- Solución de NBT y BCIP: NBT al 0.03% y BCIP al 0.015% en tampón AP. El NBT y el BCIP se preparaban concentrados 100 veces (30 mg y 15 mg en 1 ml de DMSO al 70% respectivamente) y se mantenían a  $-20^\circ\text{C}$ . La dilución en el tampón AP se realizaba en el momento de usar.

- Soluciones A y B del KIT comercial para "ECL western blotting" de Amersham.

### 16.2. Procedimiento.

Una vez separadas las proteínas de la muestra mediante electroforesis en gel de poliacrilamida y transferidas a la membrana, se procedía a la detección inmunológica del

transportador, o en su caso de la Ub, utilizando un suero inmune obtenido, respectivamente, frente a estas proteínas (Materiales 2.3). Para ello, la membrana con las proteínas transferidas se incubaba con abundante solución de bloqueo durante, al menos, 1 hora. Se lavaba 5 veces durante 5 minutos con solución de lavado y se incubaba con el suero inmune frente al transportador diluido 1/1000 en la solución de lavado añadida de 0.1% BSA durante 1 hora, o en su caso, con el suero inmune frente a la Ub diluido 1/100 en la misma solución. Se retiraba esta solución y se lavaba la membrana como se ha descrito más arriba. El suero inmune y los anticuerpos diluidos se guardaban a 4°C para su reutilización.

Para visualizar los complejos antígeno-anticuerpo formados se utilizaba un segundo anticuerpo, también denominado anticuerpo secundario, que estaba conjugado bien a fosfatasa alcalina o bien a peroxidasa (Materiales 2.3). En el primer caso, la membrana se incubaba con el anticuerpo diluido 1/3000 en solución de bloqueo durante 30 minutos. Se lavaba 5 veces durante 5 minutos con solución de lavado y 2 veces durante 5 minutos con el tampón AP. A continuación, la membrana se incubaba con la solución de NBT y BCIP, descrita más arriba, hasta la aparición de bandas con coloración púrpura. La fosfatasa alcalina en presencia de NBT y BCIP desencadena una reacción de oxido-reducción en la que se forma un compuesto insoluble de color púrpura. Esta reacción, y por tanto la aparición del color, se paraba lavando la nitrocelulosa con abundante agua. La membrana se secaba al aire y se guardaba en oscuridad. Cuando se usaba anticuerpo secundario conjugado a peroxidasa, la membrana se incubaba con dicho anticuerpo diluido en solución de bloqueo 1/10000 durante 1 hora y se lavaba 5 veces durante 5 minutos con solución de lavado. A continuación, la nitrocelulosa se sumergía durante 1 minuto en una mezcla al 50% de las soluciones A y B del KIT comercial para "ECL western blotting". La peroxidasa en esta solución produce una reacción de oxidación que emite luz. Esta luz se detectaba con películas de autorradiografía. Los tiempos de exposición variaban entre 1 y 10 minutos.

Todas las incubaciones se realizaban a temperatura ambiente y con agitación suave.

### **17. Estimación del contenido de transportador de maltosa en la célula.**

Para determinar el contenido de transportador de maltosa en la célula se sometían a electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida cantidades crecientes de extracto crudo, de 5 a 20 µg de proteína. Una vez transferidas las proteínas a la membrana, el complejo antígeno(transportador)-anticuerpo se detectaba utilizando el anticuerpo secundario conjugado a fosfatasa alcalina. Las intensidades de las bandas correspondientes al transportador se cuantificaban mediante densitometría utilizando el programa de ordenador NIH image 1.42. El área de los picos obtenidos se medían en pixels. Las intensidades de estas bandas, en valores relativos, se representaban frente a la cantidad de proteína aplicada en el gel y se trazaba la recta correspondiente. La pendiente de esta recta se consideraba proporcional al contenido celular de transportador de maltosa.

## **18. Técnicas básicas de biología molecular.**

### **18.1. Aislamiento de ADN plasmídico de *E. coli*.**

El aislamiento de ADN plasmídico de *E. coli* a pequeña y gran escala se realizaba siguiendo los métodos descritos en Sambrook et al. (1989) (111) y Birnboim (1983) (10) respectivamente.

### **18.2. Digestión de ADN con endonucleasas de restricción.**

La digestión de ADN con enzimas de actividad endonucleásica se realizaba según se describe en Sambrook et al. (1989) (111), utilizando los tampones y condiciones de incubación recomendados por los fabricantes de enzimas.

### **18.3. Análisis de los fragmentos de restricción.**

Los fragmentos de restricción obtenidos en la digestión de ADN, se separaban mediante electroforesis horizontal en geles de agarosa. Los geles de agarosa se preparaban al 0.7% en el tampón TBE que contenía Tris-borato 90 mM pH 8.0, EDTA 2 mM, añadido de 5 mg/ml de bromuro de etidio según se describe en Sambrook et al., 1989 (111), La electroforesis se realizaba sumergiendo los geles en TBE y aplicando un voltaje de 70-90 voltios. Las bandas de los fragmentos de ADN se hicieron visibles iluminándolos con un transiluminador de luz ultravioleta.

El tamaño de los fragmentos se estimó por referencia a las distancias de migración del marcador de peso molecular número VII de Boehringer Mannheim.

### **18.4. Extracción de ADN de geles de agarosa.**

Una vez separados los fragmentos de restricción en el gel de agarosa, se aislaba la banda que contenía el fragmento de restricción de interés y se extraía el ADN de la agarosa utilizando el kit "clean-a-gene" (Renner GmbH) siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante. El ADN recuperado se disolvía en 10-20 µl de agua.

### **18.5. Clonaje de fragmentos de ADN.**

Los vectores en los que se iba a realizar el clonaje y los plásmidos de los que se iba a obtener el fragmento de interés, se digerían con las endonucleasas de restricción adecuadas. Cuando se utilizaba una única enzima, los extremos 5' del vector se defosforilaban mediante tratamiento con fosfatasa alcalina de intestino de ternera. El vector digerido y el fragmento de ADN, previamente aislado y extraído de la agarosa según se describe en el apartado anterior, se ligaban mediante tratamiento con la ADN ligasa del fago T4 siguiendo el protocolo descrito en Sambrook et al., 1989 (111). Para seleccionar los fragmentos de ADN ligados, es decir, los plásmidos obtenidos, se transformaban células de *E. coli* (Métodos 19.1) con parte de la mezcla del ligamiento. Con objeto de conocer que transformantes contenían el plásmido de interés para nosotros, algunos de los transformantes se pasaban a medio líquido selectivo (LB con ampicilina) para obtener más masa celular, se aislaba el ADN plasmídico y se realizaba un análisis de restricción del mismo.

## 19. Transformación celular.

### 19.1. Transformación de *E. coli*.

La transformación de *E. coli* se realizaba según se describe en Hanahan (1986) (43) Células de *E. coli* competentes preparadas según se describe en el método de Hanahan fueron congeladas a  $-70^{\circ}\text{C}$ . En el momento de usarlas se dejaban descongelar en hielo y se separaban alícuotas de 50  $\mu\text{l}$  en eppendorf estériles. Se añadía 0.5  $\mu\text{l}$  de ADN plasmídico ó 5  $\mu\text{l}$  de la mezcla de ligamiento y, en el caso del control, el mismo volumen de tampón TE estéril (Tris-HCl 10 mM pH 7.6, EDTA 1mM). Se incubaba en hielo durante 30 minutos y, a continuación, la suspensión se sometía a un choque térmico,  $42^{\circ}\text{C}$  durante 90 segundos. Se añadía 1 ml de medio LB y se incubaba a  $37^{\circ}\text{C}$  durante 1 hora para que las células expresaran el gen de resistencia a ampicilina y recuperasen la estructura de la pared celular. Se extendían 50-200  $\mu\text{l}$  en placas de LB con ampicilina y se incubaban a  $37^{\circ}\text{C}$  durante 16-20 horas. Una vez obtenidas colonias aisladas, éstas se pasaban a un medio líquido selectivo (LB con el antibiótico) para obtener más masa celular. Este cultivo se utilizaba bien para guardar las células a  $-70^{\circ}\text{C}$  o bien para aislar el ADN plasmídico.

### 19.2. Transformación de *S. cerevisiae*.

La transformación de células de *S. cerevisiae* se realizaba siguiendo los dos métodos descritos más abajo:

- Método descrito por Ito et al. (1983) (60). Células correspondientes a 50 ml de cultivo en fase exponencial de crecimiento se lavaban con 10 ml de agua estéril y después con 10 ml de TELi (LiCl 0.1 M disuelto en tampón TE). Se suspendían en 0.5 ml de TELi y se incubaban a  $30^{\circ}\text{C}$  con agitación suave durante 1 hora. Transcurrido este tiempo, se tomaban alícuotas de 100  $\mu\text{l}$  de la suspensión celular a las que se añadían 50  $\mu\text{g}$  de ADN de esperma de salmón y el ADN plasmídico que se quería transferir a la célula (1-10  $\mu\text{g}$  diluido en un volumen menor de 10  $\mu\text{l}$ ). Se incubaban a  $30^{\circ}\text{C}$  durante 20 minutos sin agitación. Se añadía 0.7 ml de una solución de PEG 4000 preparada al 36% en TELi, se incubaba a  $30^{\circ}\text{C}$  durante 1 hora y después a  $42^{\circ}\text{C}$  durante 5 minutos. Finalmente, se centrifugaba 10 segundos en microfuga, se suspendían las células en 0.2 ml de agua estéril y, la suspensión se extendía en placas conteniendo el medio sólido de selección y las placas se incubaban a  $30^{\circ}\text{C}$  durante 2-4 días.

- Método de transformación en un único paso descrito por Chen et al. (1992) (19). Células correspondientes a 1 ml de cultivo en fase estacionaria de crecimiento se suspendían, con ayuda de vortex, en una solución que contenía 0.2 M acetato de litio pH 5.0, 40% PEG 4000, 100 mM DTT. Se añadían 50  $\mu\text{g}$  de ADN de esperma de salmón y el ADN plasmídico que se quería transferir a la célula (1-10  $\mu\text{g}$  diluido en un volumen menor de 10  $\mu\text{l}$ ) y se incubaba a  $45^{\circ}\text{C}$  durante 45 minutos. Transcurrido este tiempo, la suspensión se extendía en placas conteniendo el medio sólido de selección y las placas se incubaban a  $30^{\circ}\text{C}$  durante 2-4 días.

En ambas transformaciones, para detectar posibles contaminantes, una alícuota se trataba de forma similar y en paralelo pero sin añadir ADN plasmídico.

***RESULTADOS***



***RESULTADOS I***

**Mecanismo de inactivación del transportador.**

Como se ha descrito en la introducción, el transportador de maltosa, al igual que otras proteínas de membrana plasmática, se inactiva tras la inhibición de la síntesis de proteínas (57, 78). Esta inactivación, conocida como "inactivación catabólica", es un proceso irreversible estimulado por la presencia de glucosa que sigue una cinética de primer orden y que afecta principalmente a la  $V_{max}$  (14, 25, 78). Estas características sugieren que la inactivación podría ser debida a degradación del transportador. Para comprobar esta hipótesis nos propusimos medir el contenido celular de esta proteína así como sus eventuales variaciones durante la inactivación. Con objeto de obtener anticuerpos policlonales frente al transportador iniciamos una colaboración con la Dra. Herweijer de Gist-Brocades (Delft, Holanda) y una vez obtenidos, como se ha descrito en Materiales 2.3, pasamos a elegir unas cepas de levadura que nos permitieran, por un lado, testar estos anticuerpos y, por otro, probar nuestra hipótesis.

### **I.1. Elección de las cepas de levadura.**

Como ya se ha mencionado, el transportador de maltosa está codificado por 5 genes (*MAL11*, *MAL21*, *MAL31*, *MAL41* y *MAL61*), cada uno de ellos situado en distintos cromosomas (20). Dado que estos genes presentan una gran homología (20), los anticuerpos obtenidos frente a la proteína codificada por uno de ellos podrían reconocer las proteínas codificadas por los otros genes homólogos. Por otra parte, además de los transportadores de maltosa mencionados, se ha identificado otro transportador, conocido como el transportador de isomaltosa, codificado por el gen *AGT1* (42). Esta proteína, al igual que los transportadores de maltosa propiamente dichos, también transporta maltosa, se induce en presencia de este azúcar y es reprimible por glucosa. Los transportadores de maltosa y el transportador de isomaltosa muestran diferente especificidad: mientras que el transportador de maltosa sólo transporta maltosa y turanosa, el de isomaltosa puede transportar isomaltosa, maltotriosa y  $\alpha$ -metilglucósido, además de maltosa y turanosa (15, 20). Dado que el transportador de isomaltosa es idéntico en un 57% al transportador de maltosa (42), también podría ser reconocido por los anticuerpos obtenidos frente al transportador de maltosa.

Teniendo en cuenta todos estos hechos, para medir con anticuerpos el contenido celular de un transportador de maltosa parecía necesario que la cepa utilizada tuviera sólo uno de los 5 posibles transportadores de maltosa y además, que no tuviera el transportador de isomaltosa. Por ello, utilizamos la cepa MAL1-1<sup>c</sup>-D, que no contiene ninguno de estos transportadores (105) y la transformamos con el plásmido pRM1.1, descrito en Materiales 2.2, que contiene el locus *MALI* completo, es decir, los genes que codifican el transportador de maltosa, la maltasa y el activador de la expresión de los dos genes anteriores. Comprobamos, por un lado, que la cepa transformada, a la que denominamos YLP-1T, expresaba el transportador de maltosa porque fue capaz de fermentar maltosa y, por otro lado, que no expresaba el transportador de isomaltosa puesto que no fue capaz de

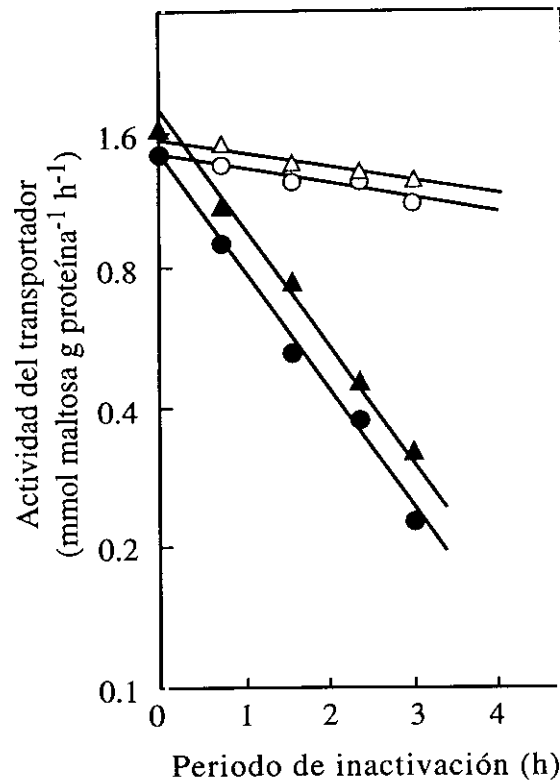
fermentar isomaltosa o  $\alpha$ -metilglucósido (Tabla 1). Para estar seguros de que el transportador de maltosa codificado por el gen *MAL11* del plásmido pRM1.1 tenía las mismas características que los de una cepa no manipulada genéticamente llevábamos como control la cepa silvestre ATCC 42407. Esta cepa es capaz crecer en un medio con maltosa como única fuente de carbono pero se ignora que locus *MAL* expresa. Comprobamos que era capaz de fermentar maltosa pero no isomaltosa o  $\alpha$ -metilglucósido. Esto indicaba que no expresaba el transportador de isomaltosa (Tabla 1). En resumen, contábamos con dos cepas capaces de fermentar maltosa pero no isomaltosa, es decir, dos cepas que expresaban el gen *MALT* y no expresaban el gen *AGT1*.

Cepas de levadura	Transporte (mmol hexosa g proteína <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )	Fermentación (mmol hexosa g proteína <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )		
	Maltosa	Maltosa	Isomaltosa	$\alpha$ -metilglucósido
MAL1-1 <sup>c</sup> -D	<0.05	<0.5	<0.5	<0.5
YLP-1T	2.6	10.1	<0.5	<0.5
ATCC 42407	2.7	15.0	<0.5	<0.5

**Tabla 1. Velocidad de transporte y fermentación.** Las células se cultivaron en medio YP con 2% glucosa (MAL1-1<sup>c</sup>-D) o 2% maltosa (YLP-1T y ATCC 42407). A mitad de la fase exponencial de crecimiento se recogió una alícuota para medir el transporte de maltosa y las células restantes se centrifugaron, se lavaron con agua y se suspendieron en medio YP con 2% del azúcar indicado y 5 $\mu$ M antimicina A. Alícuotas de estos cultivos se depositaron en los vasitos del warburg y se midió la fermentación como se indica en Métodos. Los datos corresponden a la media de dos experimentos. Los resultados de los dos experimentos diferían en menos de un 10%.

### I.2. Inactivación del transportador de maltosa en las cepas elegidas.

Los resultados mostrados en el apartado anterior indican que la cepa YLP-1T sólo expresa el transportador de maltosa codificado por el gen *MAL11* del plásmido. Para ver si el transportador codificado por este gen se inactivaba de forma similar a los de la cepa silvestre control ATCC 42407, seguimos la inactivación en presencia de dos sustratos diferentes: glucosa, que estimula la inactivación, y etanol que no la estimula (13). Los resultados obtenidos indicaron que ambas cepas se comportaban de forma similar (Figura 1). La vida media calculada para el transportador fue de aproximadamente 1.2 horas en presencia de glucosa y de >13 horas en presencia de etanol.



**Figura 1. Inactivación catabólica del transportador de maltosa en las cepas YLP-1T y ATCC 42407.**

Las cepas YLP-1T ( $\Delta$ ,  $\blacktriangle$ ) y ATCC 42407 ( $\circ$ ,  $\bullet$ ) se cultivaron en medio YP con maltosa al 2%. A mitad de la fase exponencial de crecimiento, las células se recogieron por centrifugación, se lavaron con agua y se suspendieron en un volumen del medio de inactivación 3 veces superior al volumen inicial. Este medio contenía 2% glucosa ( $\bullet$ ,  $\blacktriangle$ ) o 2% etanol ( $\circ$ ,  $\Delta$ ) como fuente de energía. Las suspensiones se incubaron a 30°C con agitación y a los tiempos indicados se recogieron alícuotas para valorar la actividad del transportador de maltosa según se describe en Métodos. Los datos corresponden a la media de dos experimentos. Los resultados de los dos experimentos diferían en menos de un 10%.

### **I.3. Idoneidad del suero inmune para detectar el transportador de maltosa.**

Para detectar el transportador, las proteínas presentes en la muestra a ensayar se separaron en geles de SDS-poliacrilamida por el sistema de glicina y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa que se trató según se indica en Métodos. Con el fin de comprobar si el suero inmune obtenido contra la proteína recombinante del transportador (Materiales 2.3) nos permitía identificar al transportador entre todas las proteínas presentes en la muestra, prestamos atención a tres hechos:

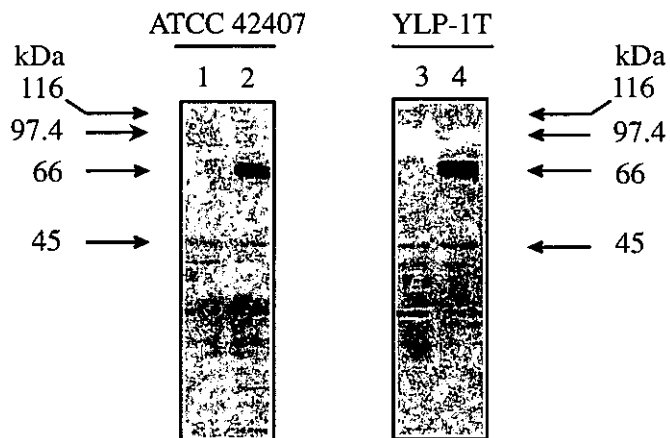
i) El transportador de maltosa es una proteína inducible por maltosa (76), por lo tanto, la banda correspondiente a esta proteína sólo deberá aparecer en muestras de células crecidas en maltosa. Los resultados obtenidos confirmaron esta predicción dado que, como puede verse en la Figura 2, el suero inmune reconoció una proteína que aparecía en muestras de células crecidas en maltosa pero no en muestras de células crecidas en glucosa.

ii) El tamaño molecular del transportador de maltosa estimado a partir de su secuencia es de 68.2 kDa, por lo tanto, si la proteína reconocida por el suero inmune correspondiese al transportador, sería de esperar que migrase en el gel de acuerdo a este tamaño molecular. Esta predicción también se cumplió puesto que la banda que aparecía sólo en muestras de células crecidas en maltosa correspondía, según indican los marcadores, a una proteína de un tamaño molecular próximo a 68 kDa.

iii) El transportador de maltosa es una proteína intrínseca de membrana plasmática y por tanto, la cantidad de transportador debería ser mayor en muestras enriquecidas en esta estructura celular. Esta predicción también se cumplió. Como puede verse en la Figura 3, la intensidad de la banda de 68 kDa, que sólo aparecía en muestras de células crecidas en maltosa, aumentó progresivamente con el enriquecimiento de la muestra en membrana plasmática.

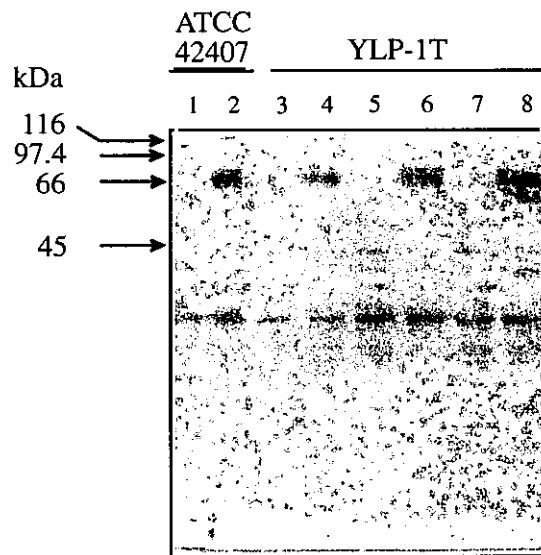
Todos estos resultados indicaban fuertemente que el suero inmune obtenido reconocía selectivamente a una proteína que, por sus características, identificamos como el transportador de maltosa. Ahora bien, como puede apreciarse en las Figuras 2 y 3, además de la banda de 68 kDa, aparecían en el inmunoblot otras bandas correspondientes a proteínas de un tamaño molecular igual o menor de 45 kDa. Estas bandas podían corresponder a: i) productos de degradación del transportador. ii) Proteínas reconocidas por anticuerpos presentes en el suero inmune pero no relacionados con el transportador. Estos anticuerpos estarían ya presentes en el suero del conejo antes de ser inyectado con la proteína recombinante del transportador, es decir, en el suero preinmune. iii) Proteínas reconocidas inespecíficamente por el anticuerpo secundario utilizado para detectar los complejos antígeno(transportador)-anticuerpo.

Con el fin de distinguir entre estas posibilidades, extractos crudos celulares obtenidos a partir de células crecidas en maltosa o glucosa, se analizaron en paralelo de tres formas distintas: con sólo el anticuerpo secundario; con el anticuerpo secundario previa incubación con el suero inmune; y con el anticuerpo secundario previa incubación con el suero



**Figura 2. Inmunodetección del transportador de maltosa.**

Las cepas ATCC 42407 y YLP-1T se cultivaron en medio YP con 2% glucosa (carriles 1 y 3) o 2% maltosa (carriles 2 y 4). Alícuotas de fracción cruda de membranas conteniendo 12  $\mu$ g de proteína se sometieron a electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida al 10%, y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa que se reveló con el suero inmune y un anticuerpo secundario conjugado a fosfatasa alcalina como se describe en Métodos. Los marcadores de peso molecular se indican en kDa.



**Figura 3. Inmunodetección del transportador de maltosa en extracto crudo, fracción cruda de membranas y fracción purificada de membrana plasmática.**

Las cepas ATCC 42407 y YLP-1T se cultivaron en medio YP con 2% glucosa (carriles 1, 3, 5 y 7) o 2% maltosa (carriles 2, 4, 6 y 8). Alícuotas conteniendo 12  $\mu$ g de proteína de extracto crudo celular (carriles 1-4), de fracción cruda de membranas (carriles 5 y 6) y de fracción purificada de membrana plasmática (carriles 7 y 8), se sometieron a electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida al 10% y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa como se describe en Figura 2. Los marcadores de peso molecular se indican en kDa.

preinmune. Dado que el transportador de maltosa es inducible por la propia maltosa (76), si las bandas correspondientes a proteínas de menor tamaño molecular estuviesen realmente relacionadas con este transportador, aparecerían sólo en extractos de células crecidas en maltosa. El hecho de que estas bandas apareciesen en extractos de células crecidas tanto en glucosa como en maltosa indicó que no estaban relacionadas con el transportador (Figura 4). Por otro lado, el hecho de que estas bandas apareciesen cuando se utilizaba el suero inmune o preinmune más el anticuerpo secundario y también cuando se utilizaba solamente el anticuerpo secundario, indicaba que correspondían a proteínas reconocidas por el anticuerpo secundario. En resumen, los resultados obtenidos nos permiten concluir que las bandas de tamaño molecular igual o menor de 45 kDa son debidas a la unión inespecífica del anticuerpo secundario a proteínas presentes en la muestra pero no relacionadas con el transportador de maltosa.

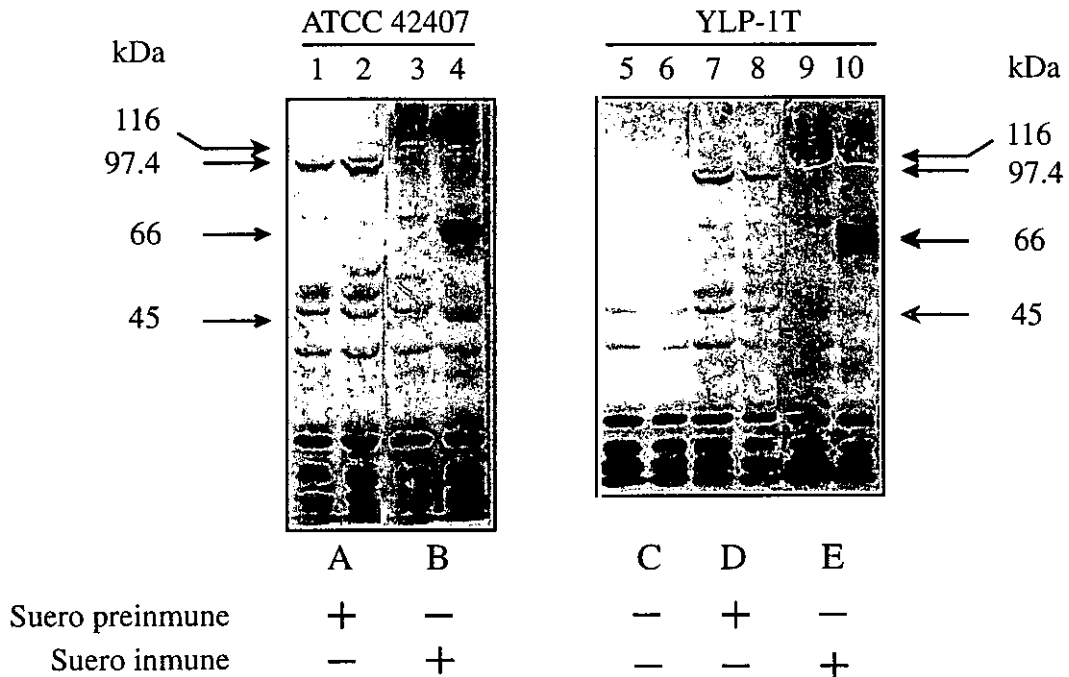
En algunos experimentos observamos que el transportador no aparecía como una única banda sino que se podían distinguir dos o tres bandas, todas ellas con un tamaño molecular muy próximo a 68 kDa (ver Figura 4). En principio, la aparición de estas bandas sí podía ser debida a una proteólisis parcial del transportador ocurrida durante la obtención de las muestras. Con objeto de investigar esta posibilidad realizamos los experimentos que se describen a continuación.

#### **I.4. Idoneidad del método de obtención de extractos celulares.**

Con el fin de comprobar si el transportador sufría una degradación parcial durante la obtención del extracto celular ensayamos dos nuevos procedimientos de extracción que, en principio, podrían dificultar la acción de las proteasas. En un caso, obtuvimos un extracto siguiendo el procedimiento habitual es decir, utilizando bolas de vidrio para romper las células en un medio tamponado a pH 8.5 pero en presencia de una mezcla de inhibidores de proteasas (Métodos 4). En otro caso, obtuvimos el extracto utilizando un medio fuertemente alcalino y en presencia de una elevada concentración de  $\beta$ -mercaptoetanol (Métodos 5) (118). Como puede verse en la Figura 5, el análisis de los extractos obtenidos por ambos procedimientos dio como resultado la aparición de varias bandas con un tamaño molecular próximo a 68 kDa. Por lo tanto, la aparición de estas bandas no parece debida a una proteólisis parcial del transportador aunque esta posibilidad no puede ser descartada totalmente.

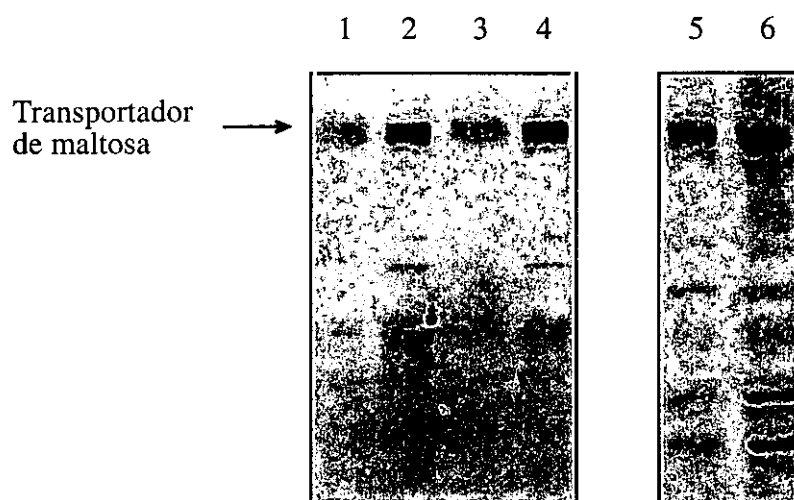
Otra posibilidad era que la pequeña variación en la movilidad electroforética de las bandas correspondientes al transportador fuera consecuencia de modificaciones post-transcripcionales, por ejemplo, glicosilación o fosforilación del transportador. Para probar si era debida a fosforilación, una muestra de membrana plasmática purificada fue tratada con fosfatasa alcalina (Métodos 10). Este tratamiento no modificó la movilidad electroforética de ninguna de las tres bandas (resultado no mostrado) lo que sugiere, aunque no descarta por completo, que estas bandas no son debidas a distintos estados de fosforilación del





**Figura 4. Detección del transportador de maltosa con suero preinmune y suero inmune.**

Las cepas ATCC 42407 y YLP-1T se cultivaron en medio YP con 2% glucosa (carriles 1, 3, 5, 7 y 9) o 2% maltosa (carriles 2, 4, 6, 8 y 10). Alícuotas de extracto crudo conteniendo 15  $\mu$ g de proteína se sometieron a electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida al 10% y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa. Tras visualizar las proteínas de la membrana con Ponceau's (Métodos), la nitrocelulosa se cortó en tiras de forma que se separasen los carriles de dos en dos: carriles 1 y 2 (Tira A), carriles 3 y 4 (Tira B), carriles 5 y 6 (Tira C), carriles 7 y 8 (Tira D), carriles 9 y 10 (Tira E). Estas tiras se revelaron como se describe a continuación: Tiras A y D, utilizando el suero preinmune y el anticuerpo secundario. Tiras B y E, utilizando el suero inmune, es decir, anticuerpos frente al transportador de maltosa, y el anticuerpo secundario. Tira C utilizando únicamente el anticuerpo secundario.



**Figura 5. Inmunodetección del transportador en extractos crudos obtenidos por distintos métodos.**

La cepa YLP-1T se cultivó en medio YP con maltosa al 2%. Alícuotas conteniendo 6 y 12  $\mu\text{g}$  de proteína de extracto crudo celular obtenido siguiendo el método habitual en ausencia (carriles 1 y 2) o presencia (carriles 3 y 4) de diversos inhibidores de proteasas, y alícuotas conteniendo 5 y 10  $\mu\text{l}$  de extracto crudo obtenido en medio alcalino (carriles 5 y 6) se analizaron como se indica en la Figura 2.

transportador. Por otra parte, la glicosilación de la proteína es una posibilidad atractiva dado que existe evidencia de que el transportador podría estar glicosilado. Se ha visto que en presencia de tunicamicina, un inhibidor de glicosilación, la síntesis del transportador está inhibida (77).

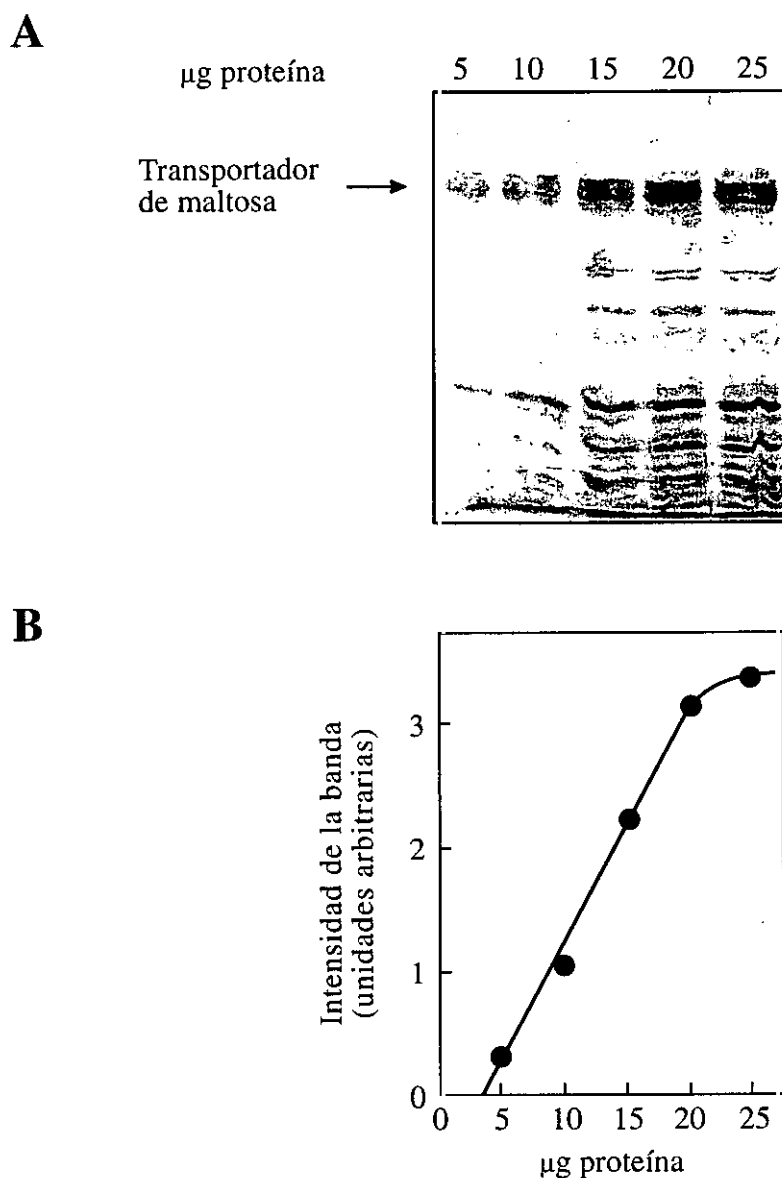
### **I.5. Puesta a punto de la determinación del contenido celular de transportador.**

Una vez establecido que el suero inmune reconoce selectivamente al transportador entre todas las proteínas de la célula y también que el transportador permanece estable durante la obtención de los extractos celulares, pasamos a fijar las condiciones necesarias para medir su contenido. Para ello debíamos establecer entre que márgenes un aumento de la cantidad de muestra analizada iba acompañado de un aumento proporcional de la intensidad de la banda del transportador. Analizamos por inmunoensayo cantidades crecientes de extracto crudo (Figura 6A), determinamos la intensidad de la banda correspondiente al transportador y la representamos frente a la cantidad de proteína analizada. Como puede verse en la Figura 6B, la intensidad de la banda aumentó proporcionalmente con la cantidad de proteína cuando se analizaron entre 5 y 20  $\mu\text{g}$  de proteína siendo la pendiente de la recta proporcional al contenido de transportador en la muestra. Cuando en vez de extracto crudo analizamos fracción cruda de membranas, la proporcionalidad sólo se mantuvo entre 2 y 8  $\mu\text{g}$  de proteína (Figura 7B). Estos márgenes de proporcionalidad se tuvieron en cuenta en el diseño de los experimentos de determinación del contenido de transportador que se describen a continuación.

Con el fin de conocer si los resultados del inmunoensayo eran reproducibles, muestras de fracción cruda de membranas obtenidas a partir de células creciendo sobre maltosa se analizaron por duplicado. Como puede verse en la Figura 7A, para una misma cantidad de muestra analizada la intensidad de la banda detectada fue la misma. Este hecho indica que los resultados son reproducibles.

### **I.6. Variación del contenido celular de transportador durante la inactivación.**

Con objeto de investigar si la inactivación del transportador es debida a su degradación, medimos el contenido celular de esta proteína utilizando extractos crudos celulares obtenidos a lo largo de la inactivación. Utilizamos extractos crudos, en vez de una fracción celular más enriquecida de transportador, por dos razones: i) la purificación, parcial o total, de membrana plasmática supone una manipulación de la muestra y por tanto, un riesgo de pérdida del transportador. Esto conduciría a errores cuando se comparase su contenido en las diferentes muestras. ii) El extracto crudo contendría todo el transportador presente en la célula lo que permitiría detectar esta proteína independientemente del compartimento celular en el que se encontrase. Así pues, para ver si el transportador de maltosa se degradaba durante la inactivación, se recogieron células en fase exponencial de crecimiento y se suspendieron en el medio de inactivación que contenía



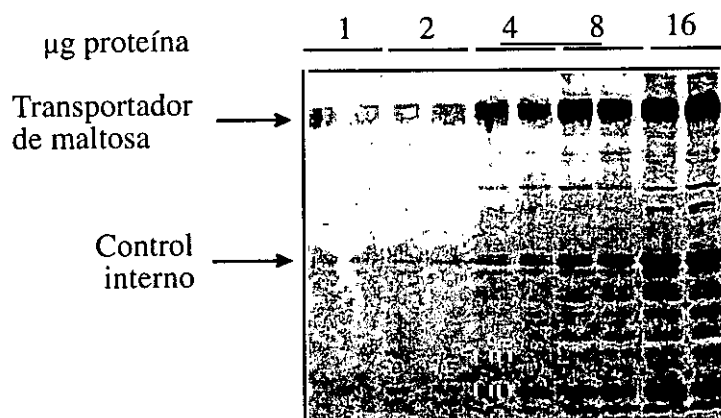
**Figura 6. Proporcionalidad entre la intensidad de la banda del transportador y la cantidad de muestra de extracto crudo celular aplicada en el gel.**

La cepa YLP-1T se cultivó en medio YP con maltosa al 2%.

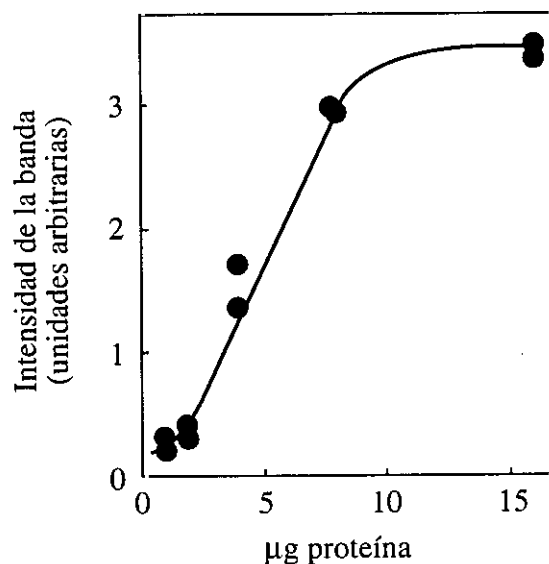
(A) Alícuotas de extracto crudo conteniendo 5, 10, 15, 20 y 25 µg de proteína se sometieron a electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida al 10% y se analizaron como en la Figura 2.

(B) Las intensidades de las bandas del transportador se midieron como se describe en Métodos y se representaron frente a la cantidad de proteína aplicada en el gel.

A



B



**Figura 7. Proporcionalidad entre la intensidad de la banda y la cantidad de muestra de fracción cruda de membranas aplicada en el gel. Reproducibilidad de los resultados.**

La cepa YLP-1T se cultivó en medio YP con maltosa al 2%.

(A) Alícuotas de fracción cruda de membranas conteniendo 1, 2, 4, 8 y 16 µg de proteína se aplicaron por duplicado en un gel de SDS-poliacrilamida al 10%, se sometieron a electroforesis y se analizaron como se indica en la Figura 2.

(B) Las intensidades de las bandas del transportador se midieron como se describe en Métodos y se representaron frente a la cantidad de proteína aplicada en el gel.

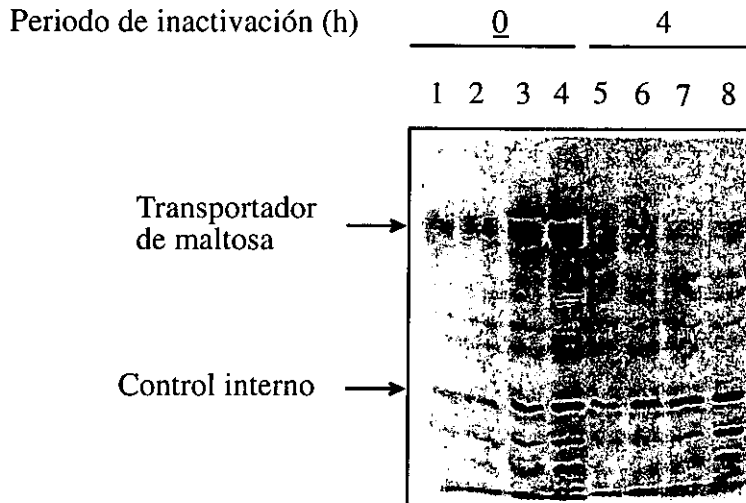
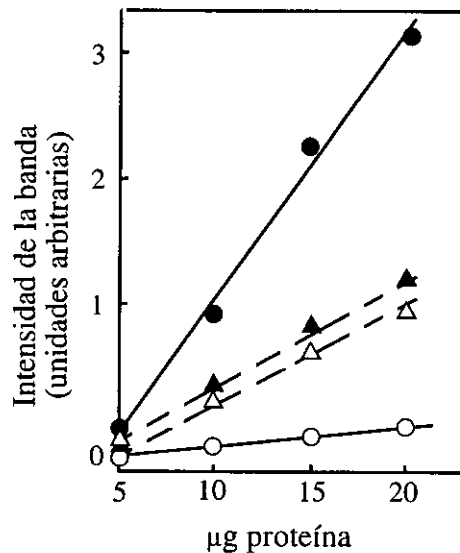
2% glucosa como fuente de energía. La suspensión se incubó a 30°C con agitación y a tiempo 0 de inactivación, es decir, inmediatamente después de suspender las células, y tras 4 horas de incubación se recogieron muestras a partir de las cuales se obtuvieron extractos crudos celulares.

Alícuotas de estos extractos conteniendo cantidades crecientes de proteína se sometieron a electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida y se analizaron con el suero inmune. Observamos que la banda del transportador de maltosa, en el caso del extracto obtenido a tiempo 0 de inactivación, era claramente detectable en todas las alícuotas analizadas (Figura 8A, carriles 1-4) mientras que, era prácticamente indetectable en el caso del extracto obtenido tras 4 horas de inactivación (Figura 8A, carriles 5-8). La determinación de las intensidades de estas bandas y su representación frente a la cantidad de proteína aplicada en el gel (Figura 8B) mostró que la pendiente de la recta, en el caso del extracto obtenido a tiempo 0, era de aproximadamente 0.16 mientras que, en el caso del extracto obtenido tras 4 horas de inactivación, la pendiente era de 0.014, es decir, unas 10 veces menor. Dado que las pendientes de estas rectas, como ya hemos comentado más arriba, son proporcionales al contenido celular de transportador, este resultado indicaba que dicho contenido había disminuido más de un 90% durante las 4 horas de incubación en las condiciones de inactivación. En principio, esta disminución observada podía no ser real sino debida a que las cantidades de proteína analizadas de los dos extractos no fuesen equivalentes. Esta posibilidad fue descartada ya que la pendiente de la recta correspondiente a una proteína control, no relacionada con el transportador de maltosa, fue la misma en ambos extractos (Figura 8, control interno).

Estos resultados nos permiten concluir que la inactivación del transportador observada durante el ayuno de amonio en presencia de glucosa es debida su degradación.

### **I.7. Correlación entre la velocidad de inactivación y de degradación del transportador.**

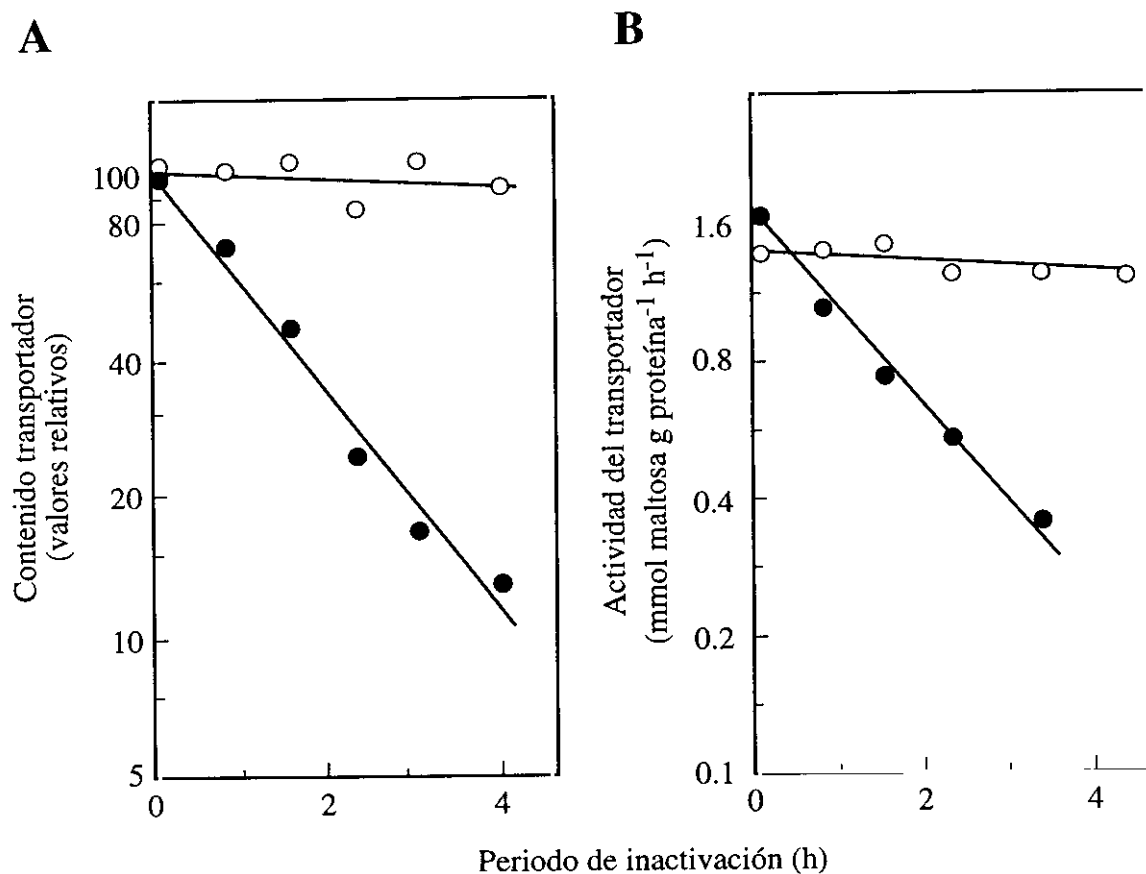
Con objeto de establecer si la inactivación y la degradación del transportador tenían lugar a la misma velocidad, medimos ambos procesos en dos condiciones en las que se sabe que la velocidad de inactivación es muy diferente: i) durante el ayuno de amonio en presencia de glucosa, condición en la que la inactivación es rápida, y ii) durante el ayuno de amonio en presencia de etanol, condición en la que la inactivación es muy lenta [94]. Como se muestra, ambos procesos, inactivación (Figura 9B) y degradación (Figura 9A), tuvieron lugar a la misma velocidad en las dos condiciones ensayadas. A partir de los datos obtenidos midiendo ambos parámetros se calculó una vida media para la actividad del transportador de 1.3 horas en presencia de glucosa y >14 horas en presencia de etanol. Los resultados mostrados se obtuvieron utilizando la cepa YLP-1T, es decir, un cepa que sólo contiene el transportador de maltosa codificado por el gen *MAL11*. Resultados similares se obtuvieron cuando se utilizó la cepa silvestre ATCC 42407, cuyo transportador de maltosa

**A****B**

**Figura 8. Disminución del contenido celular de transportador de maltosa durante la inactivación.**

La cepa YLP-1T se cultivó en medio YP con maltosa al 2%. A mitad de la fase exponencial de crecimiento, las células se recogieron por centrifugación, se lavaron con agua y se suspendieron en un volumen del medio de inactivación 3 veces superior al volumen inicial. Este medio contenía 2% glucosa como fuente de energía. La suspensión se incubó a 30°C e inmediatamente después de suspender las células (carriles 1-4), y tras 4 horas de incubación (carriles 5-8) se recogieron sendas muestras.

(A) Alícuotas conteniendo 5 µg de proteína (carriles 1 y 5), 10 µg (carriles 2 y 6), 15 µg (carriles 3 y 7) y 20 µg (carriles 4 y 8) se analizaron como se indica en Figura 2. (B) Las intensidades de las bandas del transportador de maltosa (○, ●) y de una proteína control, no relacionada con el transportador, (△, ▲) se representaron frente a la cantidad de proteína aplicada en el gel.



**Figura 9. Inactivación catabólica y degradación del transportador de maltosa en presencia de glucosa y de etanol.**

La cepa YLP-1T se cultivó en medio YP con maltosa al 2% y se trató como en Figura 8. El medio de inactivación contenía 2% glucosa (●) o 2% etanol (○) como fuente de energía. A los tiempos indicados, se recogieron alícuotas para valorar (A) el contenido celular y (B) la actividad del transportador de maltosa. Los datos corresponden a la media de dos experimentos. Los resultados de los dos experimentos diferían en menos de un 10%.



---

es codificado por uno o varios genes cromosómicos cuya identidad se desconoce (Resultados no mostrados).

En conclusión, los resultados muestran que la inactivación y la degradación del transportador de maltosa tiene lugar a la misma velocidad.

Paralelamente al desarrollo de este trabajo, y también en nuestro laboratorio, se mostró que la degradación del transportador tiene lugar en la vacuola tras su internalización por endocitosis (101).

***RESULTADOS II***

**Papel de la vía de la ubiquitina en la endocitosis del  
transportador de maltosa.**

La endocitosis es un proceso por el cual macromoléculas y solutos presentes en el medio son incluidos en el interior de vesículas que se forman a partir de la membrana plasmática. En los últimos años se ha demostrado que la internalización por endocitosis es necesaria para la degradación de la mayoría de las proteínas de membrana plasmática en células eucariotas y, en este sentido, la levadura *S. cerevisiae* no constituye una excepción. Hemos visto en el capítulo anterior que la "inactivación catabólica" del transportador de maltosa es debida a su degradación y resultados posteriores también de nuestro laboratorio han demostrado que esta degradación (101), así como la degradación de otros transportadores de este organismo (30, 59, 102, 135), tiene lugar en la vacuola tras seguir un proceso de endocitosis. Resultados recientes han puesto de manifiesto que la endocitosis de algunas proteínas requiere la presencia activa de la vía de la Ub (29, 34, 52, 70) y nosotros en este capítulo hemos investigado si la endocitosis del transportador de maltosa tiene un requerimiento semejante.

La primera etapa de la endocitosis consiste, como ya hemos dicho, en la internalización de las proteínas o solutos en vesículas. En el caso de los transportadores, esta internalización va, naturalmente, acompañada de la pérdida de su actividad y experimentos llevados a cabo en nuestro laboratorio han demostrado que la internalización de esta proteína, medida con anticuerpos, y su inactivación ocurren a la misma velocidad (81, 95, 96). Por eso en el trabajo que sigue a continuación, utilizamos indistintamente el término "internalización" e "inactivación".

Con objeto de investigar si la vía de la Ub juega un papel en la endocitosis del transportador de maltosa utilizamos dos cepas deficientes en sendas enzimas de la vía de la Ub: una cepa deficiente en una ubiquitín-proteína ligasa (enzima E3) que interviene en la unión de Ub a las proteínas sustrato, y otra cepa deficiente en una ubiquitín-hidrolasa (enzima E4) que está implicada en la liberación de Ub de los péptidos resultantes de la degradación de las proteínas por el proteasoma 26S.

### **II.1. Endocitosis del transportador de maltosa en un mutante deficiente en la ubiquitín-proteína ligasa Npi1/Rsp5.**

En levadura se han identificado dos ubiquitín-proteína ligasas (enzimas E3): la Ubr1p, que se ha implicado en la degradación por la vía denominada "N-end rule" y cuyos sustratos celulares y papel fisiológico no se conocen (6, 133), y la Npi1p/Rsp5p, proteína altamente conservada desde levadura hasta el hombre (21, 47) y que es esencial para la supervivencia de la célula. Es importante señalar que, cuando comenzamos este trabajo, la enzima Npi1/Rsp5 se había relacionado con la endocitosis y degradación en la vacuola de dos proteínas de membrana plasmática, el transportador general de aminoácidos y la uracil permeasa (34, 47). Teniendo en cuenta este hecho decidimos utilizar un mutante deficiente en esta proteína. Dado que la proteína Npi1/Rsp5 es esencial para la supervivencia de la célula, el mutante que elegimos presentaba una cierta expresión de esta proteína, lo que

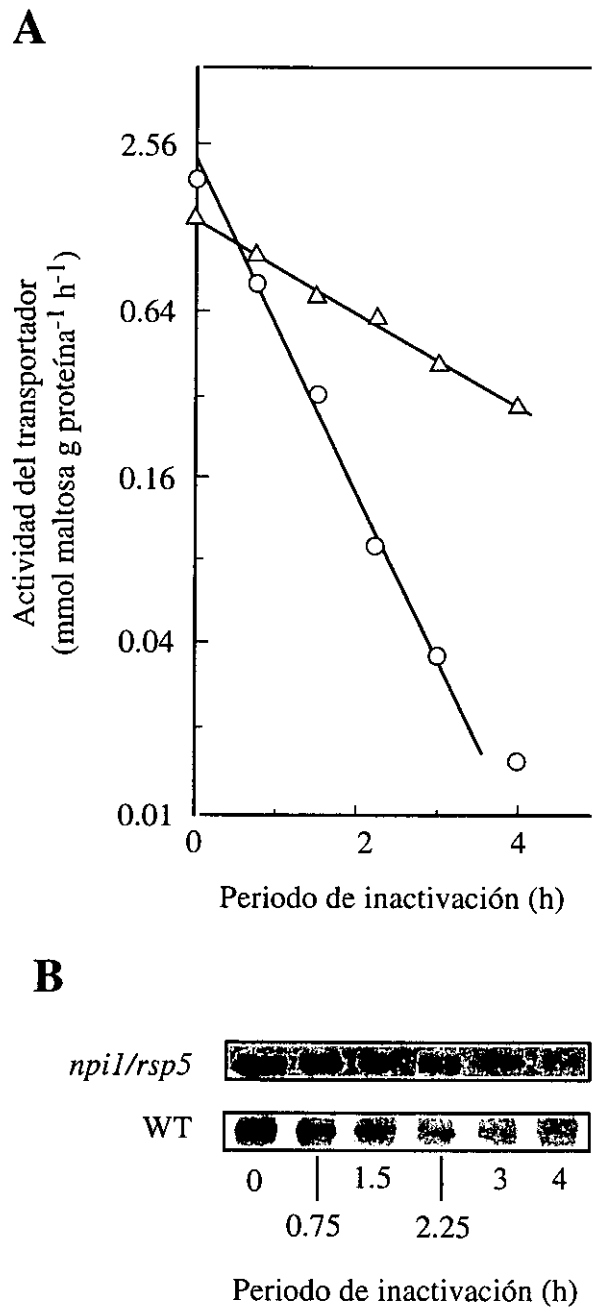
permitía su viabilidad (47). En esta cepa y en su silvestre isogénica investigamos la primera y la última etapa de la endocitosis del transportador de maltosa, esto es, la internalización y la degradación. La internalización se determinó siguiendo la disminución de su actividad con maltosa radiactiva y la degradación siguiendo la disminución del contenido celular de transportador con el suero inmune frente a esta proteína (Métodos). Ambas cepas se recogieron durante la fase exponencial de crecimiento y, con el fin de desencadenar la endocitosis del transportador, se suspendieron en el medio de endocitosis.

Como puede verse en la Figura 10A, la internalización del transportador en la cepa mutante, es decir, la disminución de su actividad, tuvo lugar a una velocidad aproximadamente tres veces menor que en la cepa silvestre. Así, la vida media estimada para el transportador en esta cepa fue de 1.8 horas mientras que, en la cepa silvestre fue de tan sólo 0.5 horas. Una diferencia similar se observó cuando, en vez de velocidad de internalización, se midió la velocidad de degradación. También la velocidad de degradación fue sustancialmente menor en la cepa mutante que en la silvestre (Figura 10B).

El hecho de que la velocidad de la primera etapa de la endocitosis, esto es, la internalización de la proteína, estuviese disminuida en la cepa deficiente en *Npi1p/Rsp5p*, sugiere que esta enzima está implicada en dicha etapa. De acuerdo con esto, la menor velocidad de degradación del transportador observada en este mutante, sería una consecuencia de la disminución de la velocidad de su internalización.

## **II.2. Endocitosis del transportador en un mutante deficiente en la ubiquitin-hidrolasa *Npi2/Doa4*.**

Una etapa fundamental de la vía de la Ub es la recuperación de Ub en su forma libre, para ser utilizada en un nuevo ciclo de degradación. Esta recuperación es llevada a cabo por las enzimas "des-ubiquitinizantes" o ubiquitin-hidrolasas (enzimas E4). En levadura se han identificado varios genes que codifican estas enzimas (94) y uno de ellos, el gen *NPI2/DOA4*, parece jugar un papel fundamental en la degradación de proteínas. Se ha visto que la delección de este gen produce una fuerte inhibición de la degradación de todos los sustratos ensayados cuya proteólisis es dependiente de Ub (94). Así pues, si la vía de la Ub estuviese implicada en la degradación de nuestro transportador, células deficientes en *Npi2p/Doa4p* mostrarían una inhibición total o parcial de su degradación. Con objeto de comprobar esta posibilidad, seguimos la endocitosis del transportador en una cepa con el gen *NPI2/DOA4* interrumpido, así como en la cepa silvestre isogénica (94). Para ello, ambas cepas se recogieron y trataron como se ha descrito anteriormente. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 11. Como puede verse, las dos etapas de la endocitosis del transportador, la internalización y la degradación, estaban sustancialmente disminuidas en la cepa mutante. Así, mientras que en la cepa mutante la vida media estimada para el transportador fue >10 horas, en la cepa silvestre fue de tan sólo 0.8 horas.

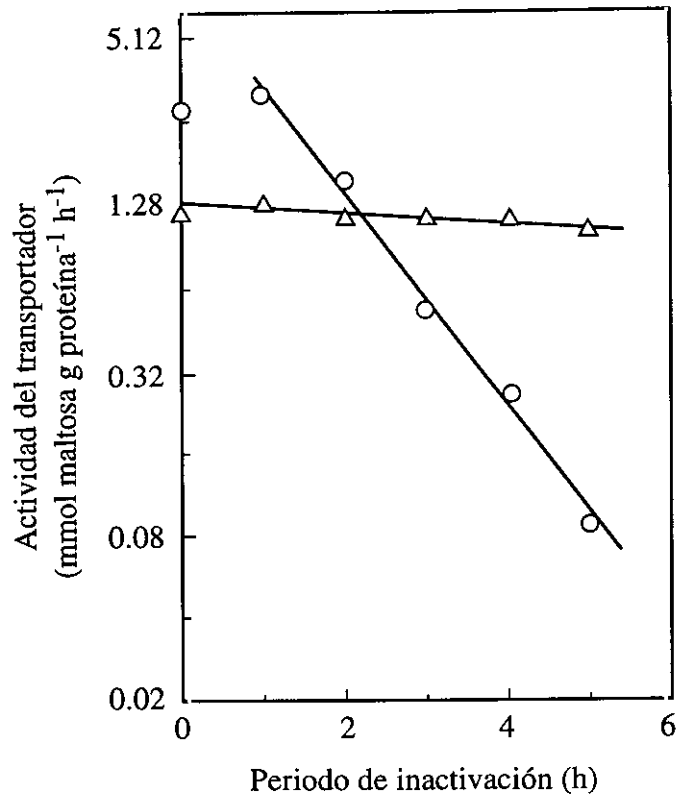
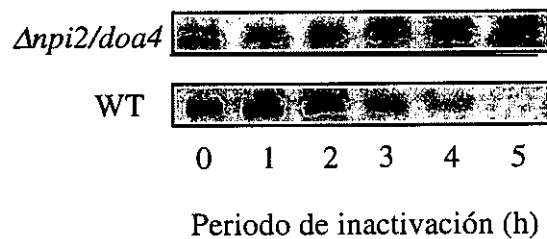


**Figura 10. Endocitosis del transportador en una cepa deficiente en la ubiquitín-proteína ligasa Npi1/Rsp5p.**

Las cepas 23346c (*NPII/RSP5*) (○) y 27028a (*npiI/rsp5*) (△) transformadas con el plásmido pRM1.1, que contiene el locus MAL1, se cultivaron en medio YP con maltosa al 2%, se recogieron durante la fase exponencial de crecimiento y se suspendieron en el medio de endocitosis (Materiales) como se describe en la Figura 8. La suspensión se incubó a 30°C con agitación.

(A) A los tiempos indicados se recogieron alícuotas para medir la actividad del transportador de maltosa. Los datos corresponden a la media de dos experimentos. Los resultados de los dos experimentos diferían en menos de un 10%.

(B) Alícuotas de extractos obtenidos a los tiempos indicados se analizaron por inmunoensayo utilizando el suero inmune frente a esta proteína.

**A****B**

**Figura 11. Endocitosis del transportador en una cepa deficiente en la ubiquitin-hidrolasa Npi2/Doa4.**

Las cepas MHY501 (*NPI2/DOA4*) (○) y MHY623 (*Δnpi2/doa4*) (△) transformadas con el plásmido pRM1.1, que contiene el locus MAL1, se cultivaron y trataron como en Figura 10. A los tiempos indicados se recogieron alícuotas para medir la actividad (A) y el contenido celular de transportador de maltosa (B). Los datos corresponden a la media de dos experimentos. Los resultados de los dos experimentos diferían en menos de un 10%.

---

Estos resultados sugieren fuertemente que la ubiquitín-hidrolasa Npi2/Doa4 juega un importante papel en la internalización de nuestro transportador y, en consecuencia, en su degradación en la vacuola.

En resumen, todos estos hechos muestran claramente que, al menos dos enzimas de la vía de la Ub, la ubiquitín-proteína ligasa Npi1/Rsp5 y la ubiquitín-hidrolasa Npi2/Doa4, son necesarias para conseguir la máxima velocidad de endocitosis del transportador de maltosa y también, que ambas enzimas intervienen en la primera etapa de la endocitosis, es decir, en la internalización de la proteína. Estos hechos indican fuertemente que la unión de Ub al transportador juega un importante papel en la endocitosis de esta proteína.

***RESULTADOS III***

**Tipo de modificación por ubiquitina que desencadena la internalización del transportador de maltosa.**

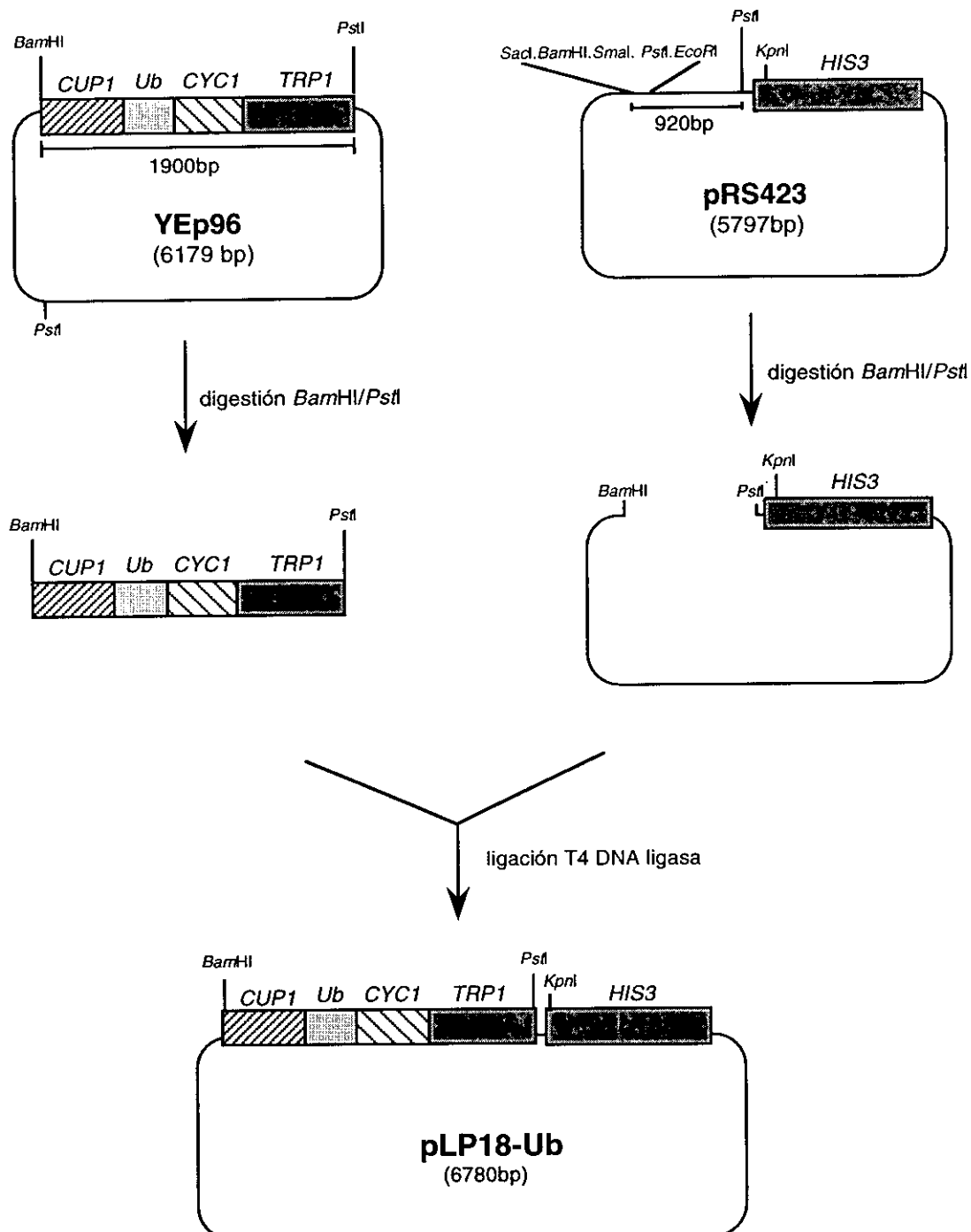


Se ha demostrado que algunas proteínas de membrana plasmática ligan Ub antes de ser internalizadas por endocitosis (34, 52, 121), y que la modificación por este péptido podría depender del tamaño y del número de TMS de la proteína. Como ya hemos comentado, en base a en ciertas evidencias se ha postulado que la máxima velocidad de internalización de las proteínas de 12-TMS podía requerir su unión a cadenas de Ub, es decir, su "poli-ubiquitinación", mientras que una "mono-ubiquitinación" sería suficiente para desencadenar la máxima velocidad de internalización de proteínas con tan sólo 7-TMS. Con objeto de poner a prueba este postulado, nos propusimos establecer los requerimientos, en lo que a Ub se refiere, de la internalización del transportador de maltosa que tiene 12-TMS.

Se sabe que las células deficientes en la ubiquitin-hidrolasa Npi2/Doa4, a las que en adelante denominaremos células  $\Delta doa4$ , presentan unos niveles de Ub libre muy bajos (94, 122). En el capítulo anterior hemos visto que en estas células, la internalización del transportador de maltosa está fuertemente inhibida, y nuestra idea es que esta inhibición es debida a la falta de Ub disponible para ligarse a la proteína. Si esta interpretación fuese correcta, la sobreexpresión de Ub en la cepa  $\Delta doa4$  podría ser capaz de restablecer la endocitosis del transportador. En este caso, la cepa  $\Delta doa4$  sería una interesantísima herramienta para estudiar el tipo de modificación por Ub que requiere la internalización de nuestra proteína. La sobreexpresión de Ubs con mutaciones en diferentes lisinas, que impedirían la formación de determinados tipos de cadenas de Ub, permitiría establecer que tipo de cadena de Ub está implicada en la endocitosis del transportador. Con el fin de investigar si la cepa  $\Delta doa4$  era adecuada a nuestros propósitos, nos propusimos obtener un plásmido adecuado para sobreexpresar Ub en estas células.

### III.1. Obtención de un plásmido adecuado para la sobreexpresión de Ub en la cepa $\Delta doa4$ .

Disponíamos de un plásmido multicopia, YEp96, que lleva el gen de la Ub bajo el promotor *CUPI* inducible por cobre y el gen *TRP1* de *S. cerevisiae* como marcador de selección (28). Sin embargo, no podíamos utilizar este plásmido para transformar las cepas *DOA4* y  $\Delta doa4$  dado que estas cepas son protótrofas para triptófano (ver Materiales: Tabla I). Para obtener un plásmido que llevase como marcador de selección el gen *HIS3*, que es uno de los adecuados a nuestras cepas, aislamos de YEp96 el fragmento *BamHI-PstI* que contiene el promotor *CUPI* y el gen de la Ub y lo clonamos en el vector pRS423 que contiene el gen *HIS3* y que había sido previamente digerido con las mismas enzimas (Esquema II). El plásmido resultante se denominó pLP18-Ub y se utilizó en los experimentos que se describen a continuación.



**Esquema II.** Estrategia seguida para la obtención de los plásmidos pLP18-Ub, pLP18-UbK29R, pLP18-UbK48R, pLP18-UbK63R, pLP18-UbRRR y pLP18Ub-no-Lys.

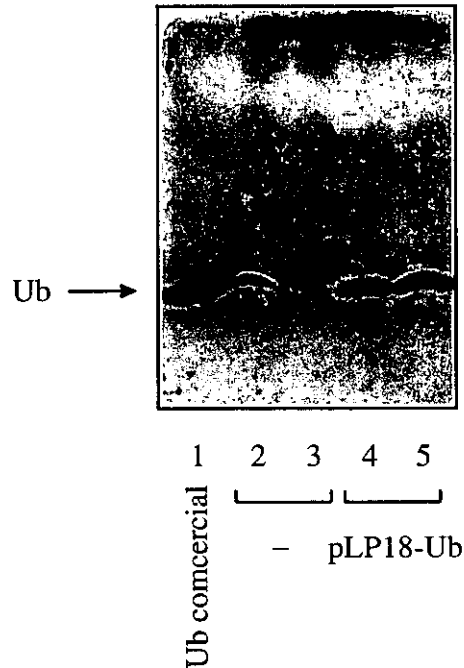
### III.2. Sobreexpresión de Ub en las cepas *DOA4* y $\Delta$ *doa4*.

Una vez transformadas las cepas *DOA4* y  $\Delta$ *doa4* con el plásmido pLP18-Ub, investigamos si estas células realmente sobreexpresaban Ub. Para ello, determinamos el contenido de Ub libre en extractos crudos obtenidos a partir de ellas y lo comparamos con el contenido en células no transformadas. Esta determinación se realizó utilizando un suero inmune comercial frente a Ub. Dado que en el plásmido pLP18-Ub la expresión del gen de la Ub es inducible por cobre, las células se crecieron en presencia de  $\text{CuSO}_4$  0.1 mM. Con objeto de identificar la banda de Ub llevábamos en paralelo una muestra control que contenía Ub comercial tratada exactamente igual que los extractos crudos celulares. Como puede verse en la Figura 12, en el caso de células sin transformar, la banda correspondiente a Ub libre fue claramente detectable en el extracto obtenido a partir de células *DOA4* (carril 2) mientras que esta banda fue prácticamente indetectable en el extracto obtenido a partir de células  $\Delta$ *doa4* (carril 3). Sin embargo, en el caso de células transformadas, la banda de Ub fue claramente detectable tanto en el extracto obtenido a partir de la cepa silvestre como en el obtenido a partir de la cepa mutante (carriles 4 y 5), y en ambos casos, su intensidad fue mayor que la obtenida con las respectivas cepas sin transformar (carriles 4 y 5 *versus* 2 y 3). Es de señalar que las intensidades de las bandas en los extractos obtenidos a partir de células *DOA4* y  $\Delta$ *doa4* transformadas fueron similares (carriles 4 y 5).

Nuestros resultados mostraron claramente que el plásmido pLP18-Ub era adecuado para sobreexpresar Ub en nuestras cepas y además (resultados no mostrados) indicaron que ni la transformación con este plásmido ni la presencia de  $\text{CuSO}_4$  0.1 mM afectaban a la velocidad de crecimiento en nuestras condiciones experimentales.

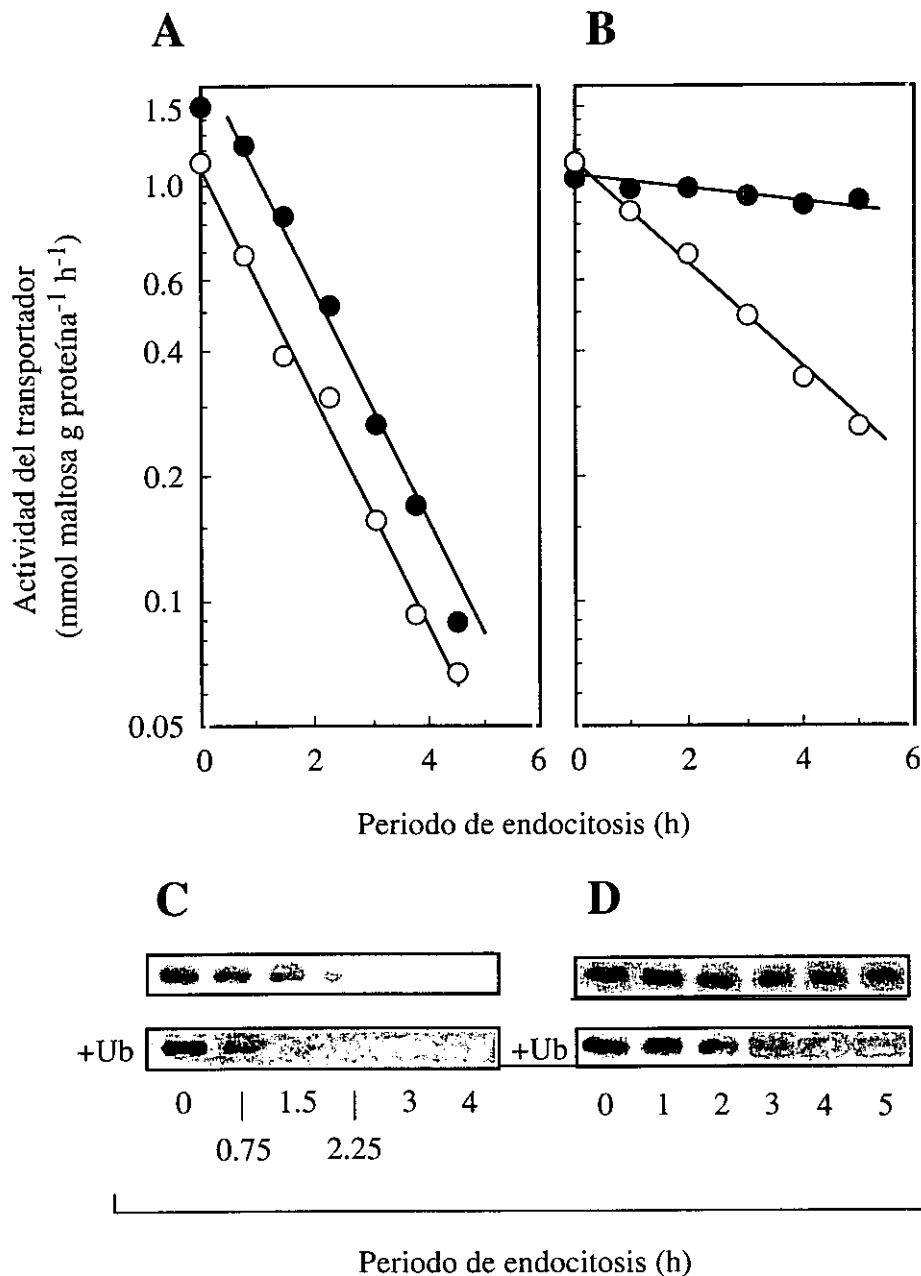
### III.3. Efecto de la sobreexpresión de Ub en la endocitosis.

Con el fin de establecer si la sobreexpresión de Ub en la cepa  $\Delta$ *doa4* era capaz de restablecer la endocitosis del transportador y también de conocer si la sobreexpresión afectaba a la cepa silvestre, seguimos la endocitosis de esta proteína midiendo su internalización y su degradación. Observamos que la sobreexpresión de Ub en la cepa *DOA4* no afectó a la endocitosis del transportador ya que como puede verse en las Figuras 13A y 13C, tanto la internalización como la degradación de esta proteína ocurrió a la misma velocidad en la cepa con y sin Ub sobreexpresada. En ambos casos la vida media estimada para esta proteína fue de 1.5 horas. Sin embargo, la sobreexpresión en la cepa  $\Delta$ *doa4* dio lugar a una recuperación considerable, aunque parcial, de la endocitosis del transportador. Este hecho se observó tanto cuando se midió la internalización de la proteína (Figura 13B) como cuando se midió su degradación (Figura 13D). Mientras que en ausencia de sobreexpresión la vida media estimada para el transportador fue >10 horas, en su presencia la vida media fue de aproximadamente 2.5 horas. Por otra parte, y como era de esperar, la expresión en estas células del vector pRS423 utilizado en la obtención del



**Figura 12. Sobreexpresión de Ub en las cepas *DOA4* y  $\Delta$ *doa4*.**

Las cepas MHY501-pRM1.1 (*DOA4*) y MHY623-pRM1.1 ( $\Delta$ *doa4*) sin transformar (carriles 2 y 3) o transformadas con el plásmido pLP18-Ub que lleva el gen de la Ub (carriles 4 y 5) se cultivaron en medio YP con maltosa al 2% en presencia de CuSO<sub>4</sub> 0.1 mM y se recogieron durante la fase de crecimiento exponencial. Alícuotas de extracto crudo conteniendo 30  $\mu$ g de proteína (carriles 2-5) se resolvieron en geles de SDS-poliacrilamida al 15% por el sistema de tricina, se transfirieron a una membrana de Immobilon-P y se analizaron con el suero inmune frente a Ub como se describe en Métodos. Para identificar la banda de Ub, se resolvió en paralelo una muestra conteniendo 1  $\mu$ g de Ub comercial (carril 1) tratada de la misma manera que las muestras problema.



**Figura 13. Efecto de la sobreexpresión de Ub en la endocitosis del transportador de maltosa.**

Las cepas MHY501-pRM1.1 (*DOA4*) (A y C) y MHY623-pRM1.1 (*Δdoa4*) (B y D) sin transformar (●) o transformadas con el plásmido pLP18-Ub que lleva el gen de la Ub (○), se cultivaron en medio YP con maltosa al 2% en presencia de CuSO<sub>4</sub> 0.1 mM, se recogieron durante la fase de crecimiento exponencial y se suspendieron en el medio de endocitosis como se describe en Figura 8. A los tiempos indicados se tomaron alícuotas para medir la actividad (A y B) y el contenido celular de transportador de maltosa (C y D). Los datos de actividad corresponden a la media de dos experimentos. Los resultados de los dos experimentos diferían en menos de un 10%.

plásmido pLP18-Ub no tuvo ningún efecto sobre la velocidad de endocitosis (Resultado no mostrado).

Acabamos de ver que la vida media del transportador en células *DOA4* y  $\Delta doa4$  en las que se había sobreexpresado la Ub fue de 1.5 y 2.5 horas respectivamente. El hecho de que la sobreexpresión de Ub no fuese capaz de revertir totalmente la inhibición de la endocitosis en las células  $\Delta doa4$  podría ser debido a una disminución de los niveles de Ub disponible en las células  $\Delta doa4$  a lo largo del experimento. Investigamos esta posibilidad y los resultados obtenidos mostraron que la cantidad de Ub disponible en la cepa  $\Delta doa4$  con Ub sobreexpresada fue elevada y se mantuvo constante durante todo el experimento de endocitosis (Figura 14). Por lo tanto, la recuperación tan sólo parcial de la endocitosis en esta cepa no puede atribuirse a una carencia de Ub y probablemente sea debida a los múltiples defectos no relacionados con la Ub que presentan las células deficientes en la proteína Doa4 (94).

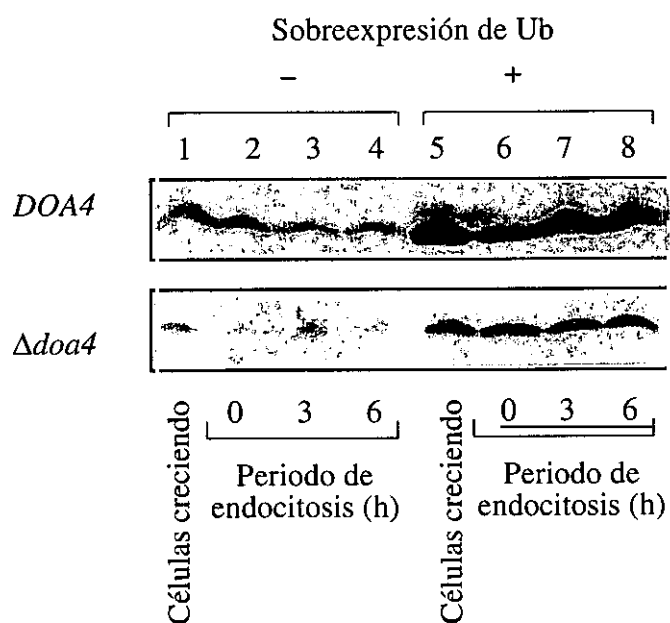
El hecho de que la sobreexpresión de Ub es capaz de revertir, al menos parcialmente, la inhibición de la endocitosis del transportador observada en la cepa  $\Delta doa4$  sugiere que esta inhibición es debida, precisamente, a los bajos niveles de Ub libre en estas células.

Los resultados también sugieren que la cepa  $\Delta doa4$  puede ser adecuada para investigar el efecto de la sobreexpresión de distintas Ubs mutadas para de esta manera, establecer el tipo de modificación que requiere la internalización del transportador de maltosa.

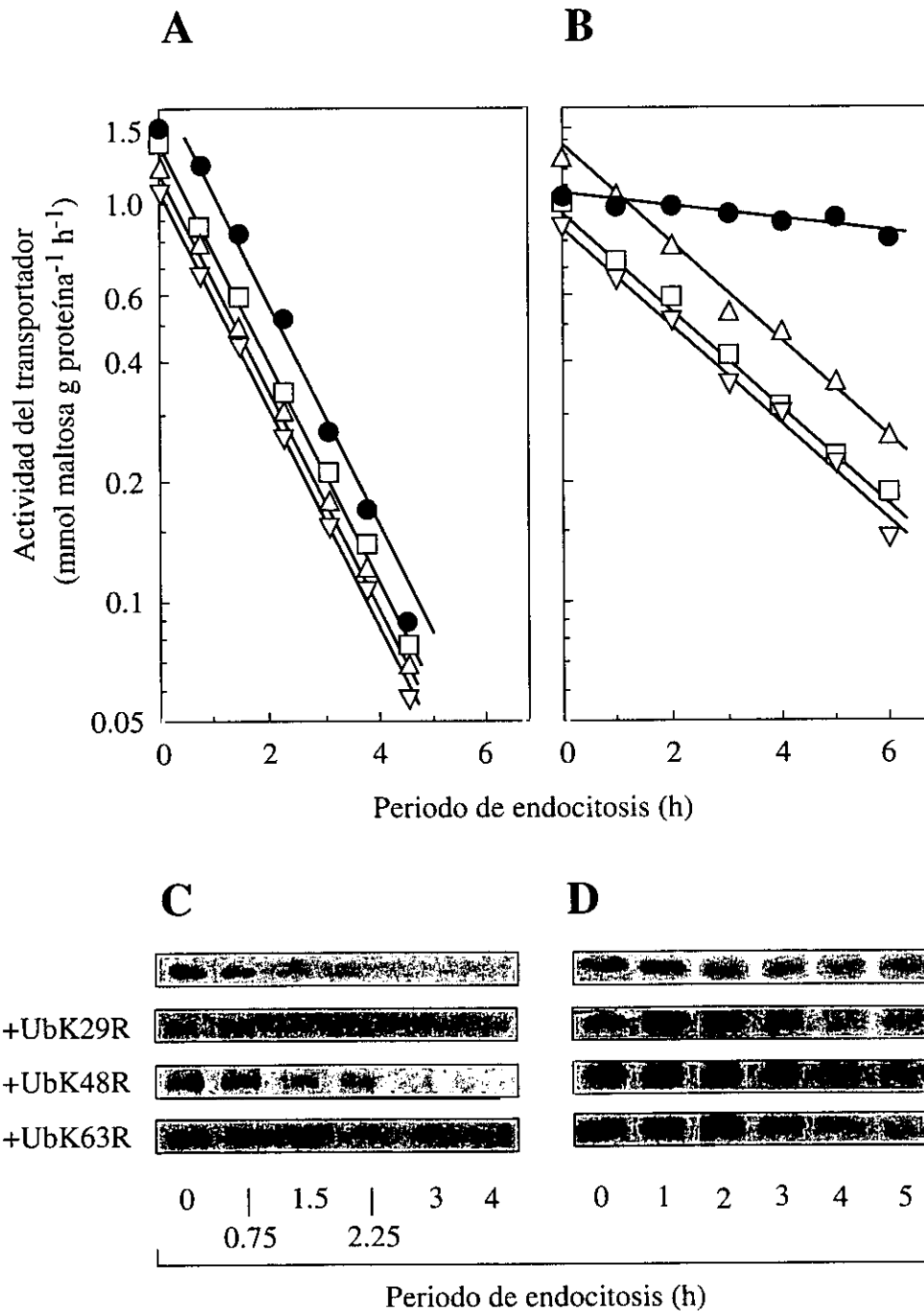
#### **III.4. Efecto de la sobreexpresión de Ubs mutadas en las lisinas-29, -48 ó -63.**

Como ya hemos mencionado, la levadura *in vivo* forma distintos tipos de cadenas de Ub en las que intervienen la Lys-29, -48 ó -63. Con el fin de conocer si alguno de estos tipos de cadenas juegan algún papel en la endocitosis del transportador de maltosa, transformamos la cepa  $\Delta doa4$  con plásmidos multicopia que contienen genes que codifican, respectivamente, Ubs en las que la Lys-29, -48 ó -63 ha sido sustituida por arginina (Tabla III). Estos plásmidos se obtuvieron siguiendo una estrategia similar a la utilizada en el caso del plásmido pLP18-Ub (ver Esquema II) a partir, respectivamente, de los plásmidos YEp96UbK29R, YEp96UbK48R y YEp96UbK63R. Observamos que la sobreexpresión de cada una de estas tres Ubs mutadas en la cepa  $\Delta doa4$  restableció la endocitosis con la misma eficacia que la sobreexpresión de Ub silvestre. Como se muestra en la Figura 15, tanto la velocidad de internalización (15B) como la de degradación (15D) del transportador aumentó sustancialmente cuando se sobreexpresó Ub. Un control desarrollado en paralelo demostró que la sobreexpresión de estas Ubs mutadas en la cepa silvestre no tuvo ningún efecto en la endocitosis (Figuras 15A y 15C).

Estos resultados sugieren que la internalización del transportador no requiere la formación de cadenas de Ub a través de la Lys-29, -48 ó -63. Esta conclusión fue confirmada por el hecho de que la sobreexpresión de una Ub con triple mutación, estas tres



**Figura 14. Presencia de Ub libre durante los experimentos de endocitosis.** Las cepas MHY501-pRM1.1 (*DOA4*) y MHY623-pRM1.1 ( $\Delta doa4$ ) sin transformar (carriles 1-4) o transformadas con el plásmido pLP18Ub que lleva el gen de la Ub (carriles 5-8), se cultivaron y se trataron como en Figura 13. Alícuotas de extractos crudos conteniendo 30  $\mu$ g de proteína obtenidos a los tiempos indicados se analizaron como se describe en la Figura 12.



**Figura 15. Efecto de la sobreexpresión de Ubs que tienen mutadas las lisinas-29, -48 y -63, respectivamente.**

Las cepas MHY501-pRM1.1 (*DOA4*) (A y C) y MHY623-pRM1.1 (*Δdoa4*) (B y D) sin transformar (●) o transformadas con el pLP18-UbK29R (□), o el pLP18-UbK48R (▽), o el pLP18-UbK63R (△) que codifican las diferentes Ubs mutadas (Tabla III), se cultivaron y se trataron como en la Figura 13. A los tiempos indicados se recogieron alícuotas para medir la actividad (A y B) y el contenido celular de transportador de maltosa (C y D). Los datos de actividad corresponden a la media de dos experimentos. Los resultados de los dos experimentos diferían en menos de un 10%.



lisinas sustituidas por argininas (Tabla III), también fue capaz de restablecer la endocitosis del transportador en la cepa mutante y no afectó a este proceso en la cepa silvestre (Figura 16).

### III.5. Efecto de la sobreexpresión de una Ub con todas sus lisinas mutadas.

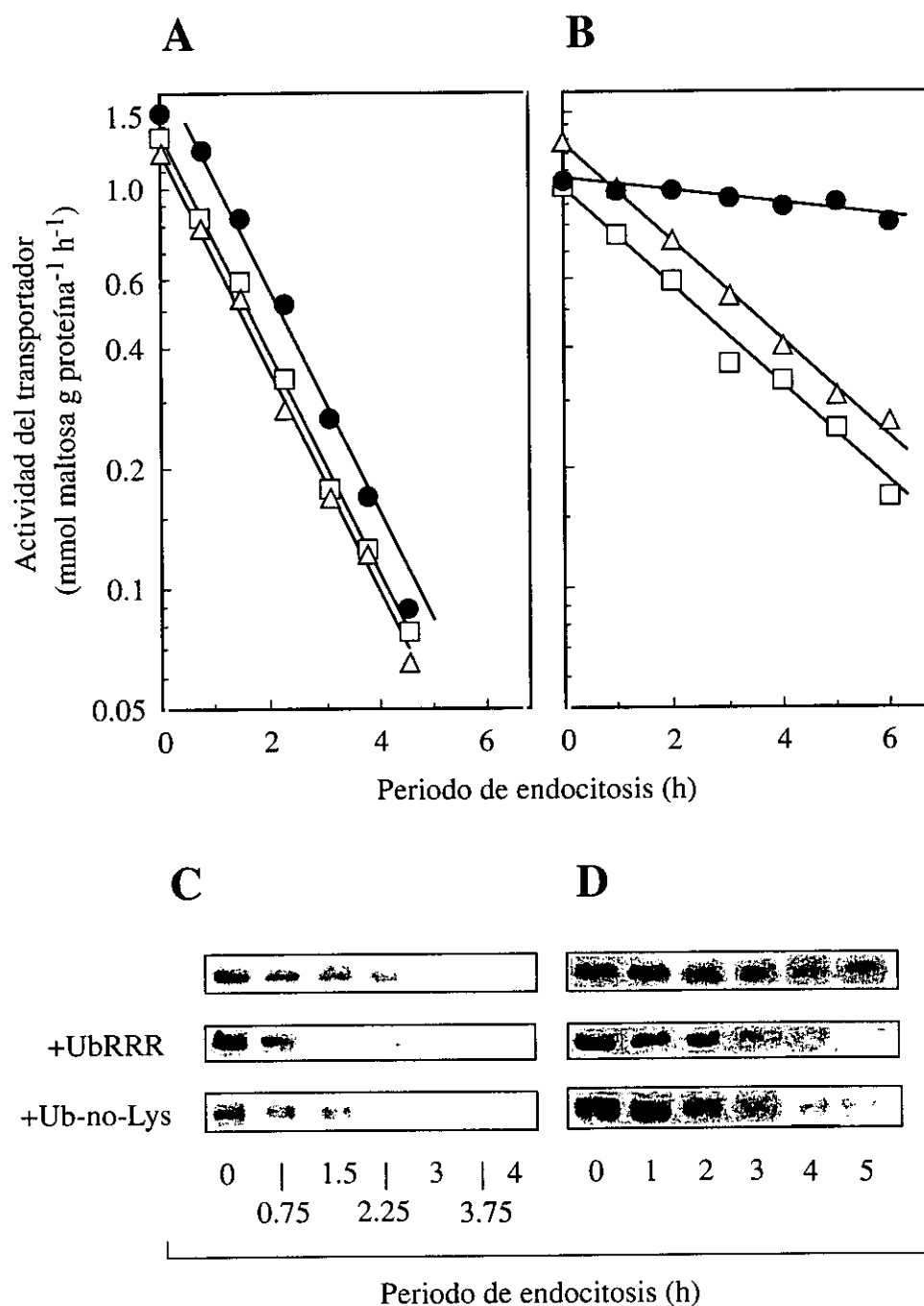
La Ub, como ya se ha comentado, además de las tres lisinas que participan en la formación de cadenas en levadura *in vivo*, contiene otras 4 lisinas situadas en posiciones -6, -11, -27 y -33 de su secuencia. La formación de cadenas de Ub por uniones a través de la Lys-6 y -11 han sido observadas *in vitro* y se ha visto que estas cadenas son capaces de unirse con alta afinidad a la subunidad 5S del proteasoma 26S humano (3). Debido a este hecho se piensa que podrían tener algún papel *in vivo*. Para determinar si alguna de estas dos cadenas, así como cadenas unidas por la Lys-27 ó -33, son necesarias en levadura para la endocitosis de nuestra proteína, utilizamos un plásmido multicopia que codifica una Ub mutante en la que sus 7 lisinas han sido sustituidas por argininas (Tabla III) y que se obtuvo a partir de LHp306 siguiendo una estrategia similar a la descrita en el Esquema II. Esta Ub mutante, denominada Ub-no-Lys, aunque es incapaz de formar cualquier tipo de cadena de Ub puede ligarse a las proteínas a través de su extremo carboxilo, es decir, es capaz de dar lugar a la "mono-ubiquitinación" de la proteína.

Como se muestra en la Figura 16, la sobreexpresión de esta Ub mutante en la cepa  $\Delta doa4$  fue capaz de restablecer la internalización (16B) y degradación (16D) del transportador con la misma eficacia que la Ub silvestre mientras que, como en los casos anteriores, la sobreexpresión de este mutante en la cepa *DOA4* no tuvo ningún efecto (Figura 16A y 16C). Estos resultados indican fuertemente que la endocitosis del transportador de maltosa no requiere la formación de ningún tipo de cadena de Ub y que la unión de una sola molécula de Ub a una o varias lisinas del transportador, lo que se denomina "mono-ubiquitinación" (33), parece ser suficiente para desencadenar su endocitosis. Con el fin de distinguir si la unión de una sola molécula de Ub es suficiente, o si por el contrario, la endocitosis de nuestra proteína requiere la unión de varias moléculas de Ub, realizamos los experimentos que se describen a continuación.

### III.6. Detección del transportador unido a Ub.

La unión de una molécula de Ub al transportador de maltosa supone un aumento de su tamaño molecular en 8.5 kDa que, en consecuencia, originará una pequeña disminución de su movilidad electroforética. Por lo tanto, la resolución en geles de poliacrilamida de una muestra que contuviese diferentes especies ubiquitinadas de nuestra proteína daría lugar a la aparición de tantas bandas como especies con distinto número de Ub estuviesen presentes.

Bansándonos en este hecho y utilizando el suero inmune frente al transportador, nos propusimos establecer el número de moléculas de Ub que liga nuestra proteína. Para ello,



**Figura 16.** Efecto de la sobreexpresión de un triple mutante de Ub que tiene mutadas las lisinas-29, -48 y -63, y de otro mutante que tiene mutadas todas las lisinas de su secuencia.

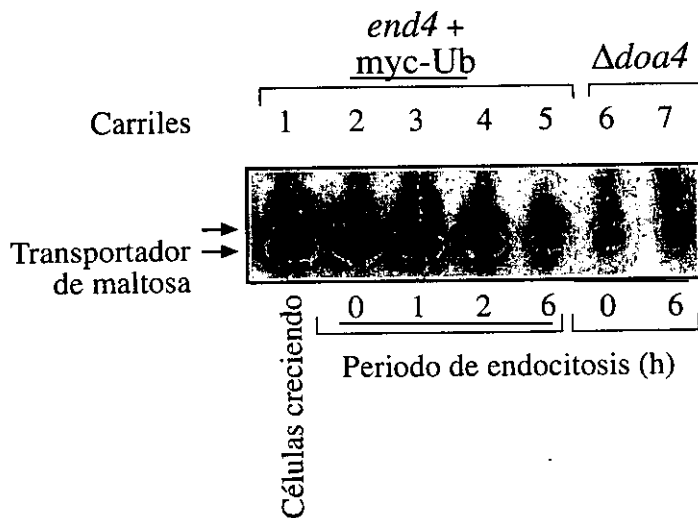
Las cepas MHY501-pRM1.1 (*DOA4*) (A y C) y MHY623-pRM1.1 (*Δdoa4*) (B y D) sin transformar (●) o transformadas con el pLP18-UbRRR (□), o pLP18-Ub-no-Lys (△) que codifican sendas Ubs mutadas (Tabla III), se cultivaron y se trataron como en Figura 13. A los tiempos indicados se recogieron alícuotas para medir la actividad (A y B) y el contenido celular de transportador de maltosa (C y D). Los datos de actividad corresponden a la media de dos experimentos. Los resultados de los dos experimentos diferían en menos de un 10%.

utilizamos una cepa mutante temperatura sensible deficiente en la proteína End4. Según resultados obtenidos en nuestro laboratorio (101), esta cepa mutante a la temperatura restrictiva de 35°C internaliza y degrada al transportador de maltosa a una velocidad mucho menor que una cepa silvestre. Como tenemos evidencia de que la unión de la Ub al transportador tiene lugar en la membrana plasmática (esta tesis), el enlentecimiento de la internalización en esta cepa podría dar lugar a la acumulación de especies ubiquitinadas de nuestro transportador. Esto facilitaría su detección.

Dado el pequeño tamaño de la Ub, las diferencias de movilidad de las diferentes especies de la proteína ligadas a Ub será muy pequeña. Con objeto de aumentar en la medida de la posible estas diferencias, transformamos la cepa mutante con el plásmido multicopia pLP2 que lleva un gen de fusión que codifica una Ub unida por su extremo amino al epitopo "c-myc" (Tabla III), cuyo tamaño es de 1.3-1.5 kDa (56).

Con el fin de detectar el transportador, tanto sin ligar como ligado a Ub, se recogieron muestras de células durante la fase exponencial de crecimiento y también a diferentes tiempos de incubación en el medio de endocitosis. A partir de estas células se obtuvieron extractos crudos que se analizaron con el suero inmune frente al transportador. Como puede verse en la Figura 17, tanto en el extracto obtenido a partir de células creciendo (carril 1) como en el de células recogidas inmediatamente después de ser suspendidas en el medio de endocitosis (carril 2), apareció una banda correspondiente a una proteína que por su tamaño molecular identificamos como el transportador libre, sin Ub ligada. Sin embargo, en el extracto obtenido a partir de células incubadas durante una o más horas en las condiciones de endocitosis (carriles 3-5) observamos dos bandas, una correspondiente a una proteína del tamaño del transportador libre y otra de mayor tamaño, que se diferenciaba de la anterior en unos 9 kDa. Identificamos a esta última banda como el transportador unido a una sola molécula de Ub. Evidencia a favor de esta conclusión se obtuvo utilizando un extracto obtenido a partir de la cepa *Δdoa4* que no tiene Ub libre que pueda ser ligada a nuestra proteína (94, 122) (carriles 6 y 7). En este caso no apareció la banda de mayor tamaño, la que supuestamente, corresponde al transportador unido a una molécula de Ub.

En resumen, estos resultados sugieren que la unión de una sola molécula de Ub es suficiente para desencadenar la endocitosis del transportador de maltosa.



### Figura 17. Detección del transportador de maltosa unido a Ub.

La cepa RH268-1C-pRM1.1 (*end4*) transformada con el plásmido pLP2 que codifica una Ub ligada al epitopo "c-myc" (carriles 1-5) y la cepa MHY623-pRM1.1 ( $\Delta$ *doa4*) (carriles 6-7) se cultivaron a 24°C y a 30°C, respectivamente. A mitad de la fase exponencial de crecimiento se recogió una alícuota para obtener extracto crudo y el resto de las células se lavaron y suspendieron en el medio de endocitosis como se indica en Figura 8. La suspensión celular correspondiente a la cepa RH268-1C-pRM1.1-pLP2 se incubó a 35°C y la correspondiente MHY623-pRM1.1 a 30°C. A los tiempos indicados se recogieron alícuotas para obtener extractos crudos. Muestras de estos extractos conteniendo 30  $\mu$ g de proteína se resolvieron en geles de SDS-poliacrilamida al 10% por el sistema de glicina, se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa y se analizaron con el suero inmune frente al transportador como se indica en Métodos.

***RESULTADOS IV***

**Significado fisiológico de la inactivación catabólica de los transportadores de azúcares.**

Como ya hemos comentado, se viene asumiendo que la inactivación catabólica por glucosa de los transportadores de azúcares distintos de los de la glucosa es un mecanismo de regulación que favorece el uso de este azúcar siempre que se halla disponible en el medio. Esta idea se basa en dos suposiciones: i) la glucosa inactiva específicamente los transportadores de azúcares distintos de los de glucosa, ii) la inactivación de estos transportadores de azúcares es producida específicamente por glucosa.

Ahora bien, hay evidencia de que la primera suposición no es correcta puesto que se ha visto que, la adición de glucosa a células ayunadas de fuente de nitrógeno desencadena la inactivación de todas las proteínas de membrana plasmática ensayadas: el transportador de  $K^+$  (8, 102), la uracil permeasa (135), la  $H^+$ -ATPasa (7) y todos los transportadores de azúcares ensayados (59, 101), incluidos algunos de los propios transportadores de glucosa (14, 71).

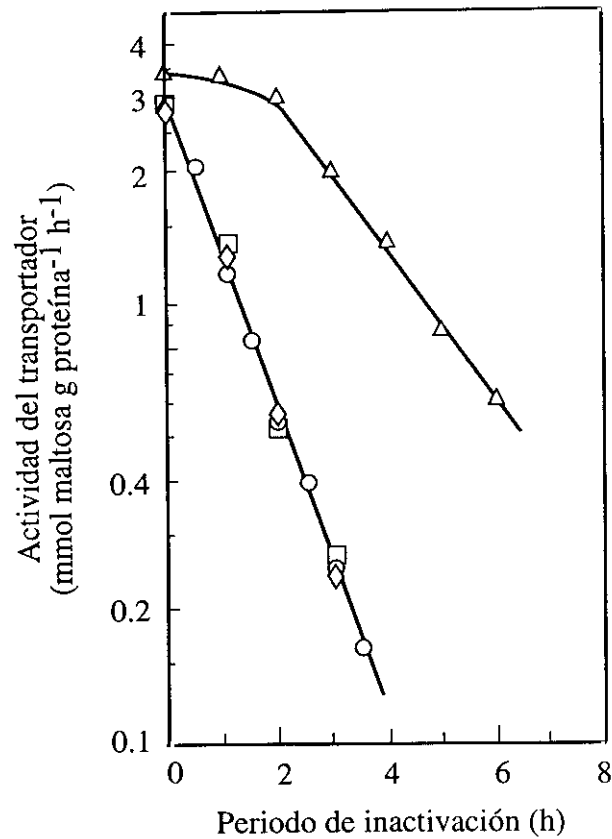
En este trabajo nos propusimos investigar si la segunda suposición tampoco es correcta, es decir, establecer si realmente la inactivación de los transportadores de azúcares es producida específicamente por glucosa o si, por el contrario, otras fuentes de carbono producen una inactivación semejante. Para ello, seguimos utilizando como modelo experimental el transportador de maltosa.

#### **IV.1. Inactivación del transportador de maltosa en presencia de glucosa, fructosa o manosa.**

La fructosa y la manosa son transportadas al interior de la célula por el mismo sistema de transporte que la glucosa (49) y, como en el caso de la glucosa, la utilización de estos dos azúcares es constitutiva, es decir, la célula contiene todas las proteínas que son necesarias para su catabolismo independientemente de la fuente de carbono en que esten creciendo (5).

Con objeto de investigar el efecto de estos tres azúcares en la inactivación del transportador de maltosa, las células se recogieron durante el crecimiento exponencial en maltosa, puesto que el transportador que estamos investigando es inducible por este azúcar (76). Tras ser suspendidas en un medio sin fuente de carbono y de nitrógeno, se añadió el azúcar a ensayar. La suspensión se incubó a 30°C con agitación y a distintos tiempos de inactivación se recogieron alícuotas para valorar la actividad del transportador. Observamos que la adición de cualquiera de estos tres azúcares, glucosa, fructosa o manosa, produjo un efecto similar en la actividad del transportador. Como puede verse en la Figura 18, la inactivación comenzó inmediatamente después de añadir el azúcar, siguió una cinética de primer orden y ocurrió a una velocidad constante que sugirió una vida media para el transportador, en presencia de estos azúcares, de aproximadamente 1 hora.

Estos resultados indicaron que los tres azúcares, glucosa, fructosa y manosa, son igualmente eficaces sosteniendo la inactivación del transportador.



**Figura 18. Inactivación del transportador de maltosa en presencia de glucosa, fructosa, manosa o galactosa.**

La cepa ATCC 42407 se cultivó en medio YP con maltosa al 2%. A mitad de la fase exponencial de crecimiento, las células se recogieron por centrifugación, se lavaron con agua y se suspendieron en un volumen del medio de inactivación 3 veces superior al volumen inicial. Este medio contenía 2% glucosa (○), 2% fructosa (◇), 2% manosa (□) o 2% galactosa (△) como fuente de energía. Las suspensiones se incubaron a 30°C con agitación y, a los tiempos indicados se recogieron alícuotas para valorar la actividad del transportador de maltosa. Los datos corresponden a la media de dos experimentos. Los resultados de los dos experimentos diferían en menos de un 10%.

## IV.2. Inactivación del transportador en presencia de galactosa.

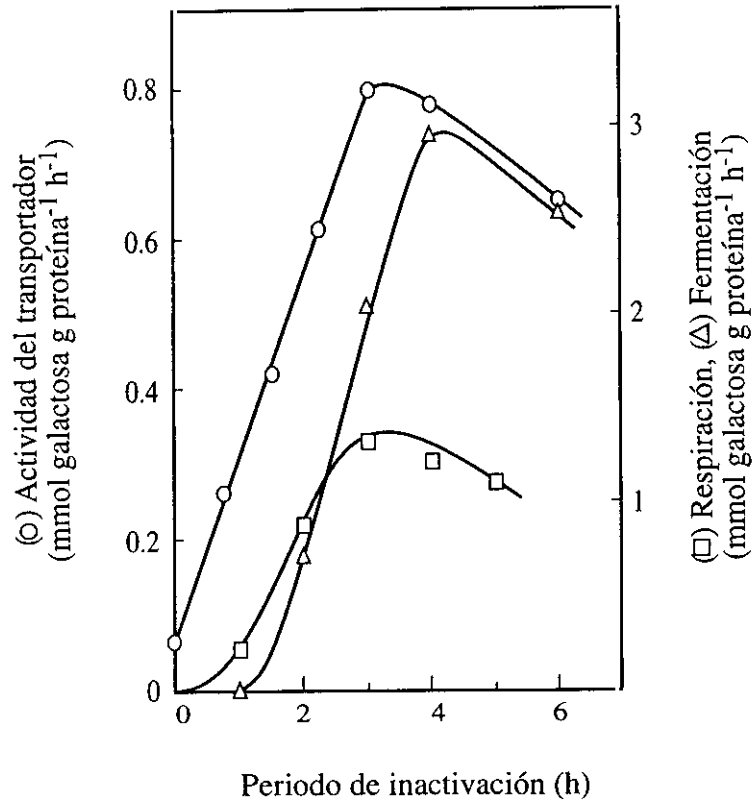
La galactosa es transportada al interior de la célula por el transportador GAL2 (129). La síntesis de este transportador, así como de las otras proteínas necesarias para el catabolismo de este azúcar, es inducible por galactosa y reprimible por glucosa, a través del activador de transcripción GAL4 (24, 65). En ausencia del inductor, la proteína GAL80 forma un complejo con la proteína GAL4 impidiendo la síntesis de las proteínas del metabolismo de galactosa. Sin embargo, en presencia de galactosa y ausencia de glucosa, el complejo GAL80p-GAL4p se disocia y, como consecuencia, GAL4p queda libre y es capaz de activar la síntesis de las proteínas mencionadas (45, 66, 85).

Para investigar el efecto de la galactosa en la inactivación del transportador de maltosa, las células se recogieron y se trataron de forma similar a los experimentos descritos anteriormente excepto que, la fuente de carbono añadida fue galactosa. Observamos que, como en el caso de la glucosa, la adición de galactosa fue capaz de desencadenar y sostener la inactivación del transportador. Sin embargo, en este caso, como puede verse en la Figura 18, se observó un retraso en el comienzo de la inactivación de aproximadamente 2 horas. A continuación, la inactivación tuvo lugar a una velocidad constante, aunque menor que en presencia de las otras hexosas ensayadas. La vida media del transportador en presencia de galactosa fue de unas 2 horas mientras que en presencia de glucosa fue de aproximadamente 1 hora.

El retraso observado en la inactivación por galactosa podía estar relacionado con la no utilización por las células de este azúcar. Dado que en estos experimentos las células se crecieron en maltosa y que la utilización de galactosa, como ya hemos mencionado, requiere proteínas que sólo se sintetizan en su presencia, las células utilizadas en el experimento no tendrían las proteínas necesarias para el catabolismo de galactosa. Por lo tanto, el retraso en el comienzo de la inactivación podía ser debido al tiempo requerido para la aparición de estas proteínas. Si esta hipótesis fuera correcta, se deberían cumplir tres predicciones:

i) En las condiciones experimentales utilizadas, ausencia de una fuente de nitrógeno exógena y presencia de galactosa, las proteínas necesarias para el catabolismo de este azúcar se sintetizarían a partir de los aminoácidos almacenados en la célula como reserva y/o a partir de los aminoácidos obtenidos en la degradación de otras proteínas. Para comprobar si esta predicción se cumplía, medimos el transporte, fermentación y respiración de galactosa durante la inactivación. Como puede verse en la Figura 19, inmediatamente después de suspender las células en el medio de inactivación, es decir, en ausencia de fuente de nitrógeno y en presencia de galactosa, las células prácticamente no fueron capaces de transportar galactosa, ni de fermentar o respirar este azúcar. Sin embargo, enseguida las células comenzaron a transportar galactosa, y este transporte aumentó progresivamente hasta alcanzar un valor máximo en aproximadamente 3 horas. La aparición de transporte fue acompañado de la aparición de fermentación y respiración.





**Figura 19. Inducción del transporte, fermentación y respiración de galactosa durante la inactivación.**

La cepa silvestre ATCC 42407 se cultivó y se trató como en Figura 18. El medio de inactivación contenía 2% galactosa como fuente de energía. La suspensión se incubó a 30°C con agitación y, a los tiempos indicados se recogieron alícuotas para valorar el transporte (○), la fermentación (△) y la respiración (□) de galactosa. Los datos corresponden a la media de dos experimentos. Los resultados de los dos experimentos diferían en menos de un 10%.

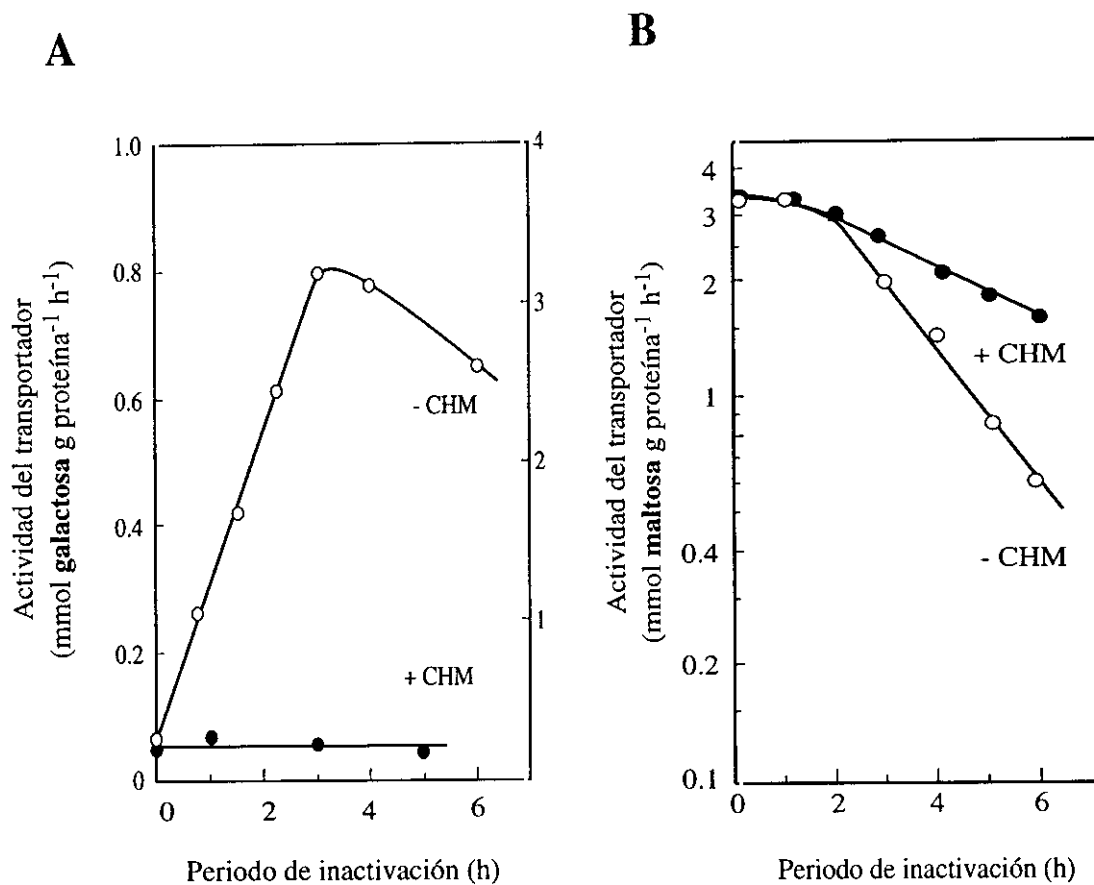
Ambos parámetros alcanzaron también su máximo valor tras 3 horas de incubación. A partir de ese momento, se observó una ligera disminución en la velocidad de los tres procesos.

En resumen, estos resultados indican que las células, en presencia de galactosa, y a pesar de la carencia de fuente de nitrógeno exógena, son capaces de sintetizar las proteínas que necesitan para el catabolismo de este azúcar.

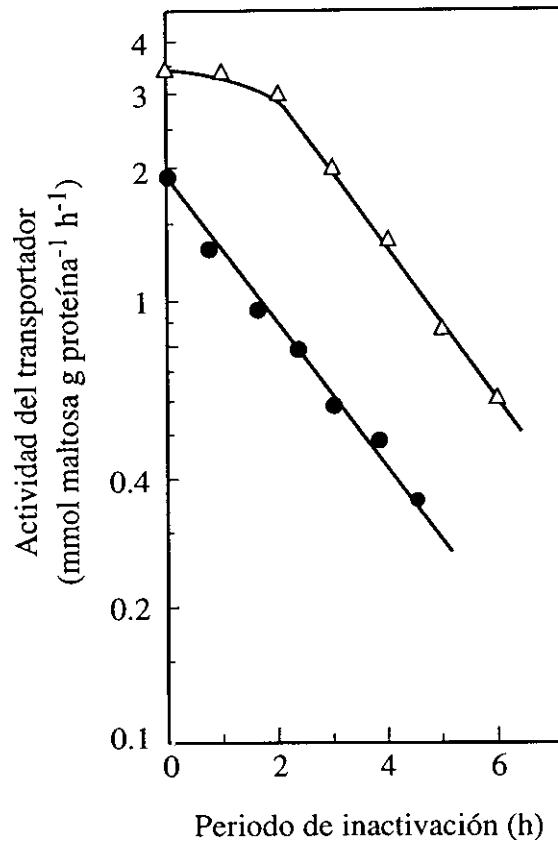
ii) Si la inactivación del transportador de maltosa requiere la inducción del catabolismo de galactosa, la inhibición de dicha inducción debería impedir la inactivación. Con el fin de comprobar esta predicción, añadimos cicloheximida, un inhibidor de la síntesis de proteínas, al medio de inactivación. Comprobamos que en nuestras condiciones experimentales, la adición de cicloheximida inhibió por completo la inducción del transporte de galactosa (Figura 20A) y por tanto, el catabolismo de este azúcar. Así mismo, observamos que en presencia del inhibidor, el transportador se inactivaba muy lentamente y no aparecía la inactivación rápida que se observaba en su ausencia (Figura 20B). Como se muestra en esta figura, mientras que en ausencia de cicloheximida, la vida media del transportador, una vez superado el periodo de adaptación, fue de unas 2 horas, en presencia del inhibidor fue >10 horas. Estos resultados indican claramente que la inducción del catabolismo de galactosa es necesaria para la rápida inactivación del transportador. Es importante señalar que la lenta inactivación observada en presencia de cicloheximida, es decir, en ausencia de catabolismo de galactosa, fue similar a la observada, como veremos más adelante, cuando el medio de inactivación no contenía ninguna fuente de carbono y energía (Figura 24).

iii) Si, como parece, el retraso en el comienzo de la inactivación del transportador fuera debido al tiempo requerido por las células para su adaptación a galactosa, células mutantes capaces de utilizar galactosa sin adaptación previa no mostrarían este retraso. Para probar esta posibilidad utilizamos una cepa mutante *gal80*. Esta cepa mutante carece de la proteína GAL80 que inhibe la síntesis de las proteínas del catabolismo de galactosa cuando no se halla presente el inductor (90). En consecuencia, esta cepa mutante sintetiza todas las enzimas necesarias para el catabolismo de galactosa incluso en ausencia de este azúcar y, por tanto, es capaz de utilizar galactosa constitutivamente. Como se muestra en la Figura 21, los resultados obtenidos mostraron que la inactivación del transportador de maltosa en la cepa mutante *gal80*, a diferencia de lo observado en la cepa silvestre, comenzó inmediatamente después de añadir la galactosa. También mostraron que la velocidad de inactivación del transportador en esta cepa fue similar a la velocidad de inactivación que mostró la cepa silvestre una vez transcurridas las 2 primeras horas.

En resumen, todos los resultados obtenidos indican fuertemente que la galactosa, al igual que las otras hexosas ensayadas, glucosa, fructosa y manosa, es capaz de sostener la inactivación del transportador de maltosa, si bien lo hace a una velocidad 2 veces inferior a la observada en presencia de esas otras hexosas (ver Figura 18).



**Figura 20. Inhibición por cicloheximida de la inducción del transporte de galactosa y de la inactivación por galactosa del transportador de maltosa.** La cepa ATCC 42407 se cultivó y se trató como en Figura 18. El medio de inactivación contenía 2% galactosa como fuente de energía. La suspensión celular se dividió en dos alícuotas y, a una de ellas (●) se añadió cicloheximida para una concentración final 10 µg/ml. Las suspensiones se incubaron a 30°C con agitación y, a los tiempos indicados se recogieron alícuotas para valorar la actividad del transportador de (A) galactosa y (B) maltosa. Los datos corresponden a la media de dos experimentos. Los resultados de los dos experimentos diferían en menos de un 10%.



**Figura 21. Inactivación del transportador de maltosa en una cepa silvestre y en una cepa *gal80*.**

La cepa silvestre (ATCC 42407) ( $\Delta$ ) y el mutante *gal80* (X106-3D) ( $\bullet$ ) se cultivaron y trataron como se describe en Figura 18. El medio de inactivación contenía 2% galactosa como fuente de energía. A los tiempos indicados se recogieron alícuotas para valorar la actividad del transportador de maltosa. Los datos corresponden a la media de dos experimentos. Los resultados de los dos experimentos diferían en menos de un 10%.

### **IV.3. Inactivación del transportador en presencia de maltosa.**

Con objeto de investigar si la maltosa era capaz de sostener la inactivación de su propio transportador, realizamos experimentos similares a los descritos en los capítulos anteriores excepto que, la fuente de carbono añadida al medio de inactivación fue maltosa. Los resultados mostraron que en presencia de este azúcar también se inactivó el transportador y que, al igual que en el caso de la glucosa, la inactivación comenzó inmediatamente después de añadir el azúcar (Figura 22). Sin embargo, la velocidad de inactivación en presencia de maltosa fue sustancialmente menor que en presencia de glucosa ya que, mientras que la vida media estimada para el transportador en presencia de este azúcar fue de aproximadamente 1 hora, en presencia de maltosa fue de unas 2 horas (Figura 22).

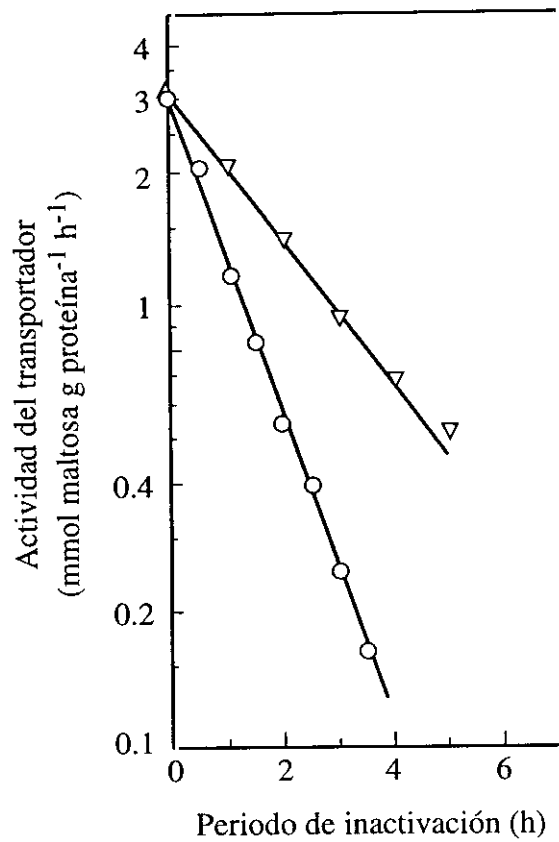
Ahora bien, dado que la utilización de maltosa se induce en presencia de este azúcar (76), en las condiciones utilizadas en estos experimentos, y al igual que ocurría en los experimentos con galactosa, podrían estar ocurriendo dos procesos: 1) Síntesis del transportador de maltosa, inducida por la presencia de su inductor. Esta síntesis, como en el caso del transportador de galactosa, tendría lugar a partir de los aminoácidos almacenados en la célula como reserva y/o a partir de los aminoácidos obtenidos en la degradación de otras proteínas. 2) Inactivación del transportador de maltosa ya presente en las células al comenzar el experimento.

Por tanto, si esta hipótesis fuera correcta, estarían teniendo lugar simultáneamente dos procesos opuestos: por un lado, síntesis del transportador y, por otro lado, su inactivación. La presencia simultánea de estos dos procesos de signo contrario daría lugar a una disminución aparente en la velocidad de inactivación. Para comprobar esta hipótesis, se inhibió la síntesis del transportador con cicloheximida. Los resultados mostraron que, en presencia del inhibidor, la velocidad de inactivación por glucosa no se vio afectada mientras que la velocidad de inactivación por maltosa aumentó. En estas condiciones, la vida media calculada para el transportador en presencia de maltosa fue de aproximadamente 1 hora, es decir, similar a la obtenida en presencia de glucosa (Figura 23).

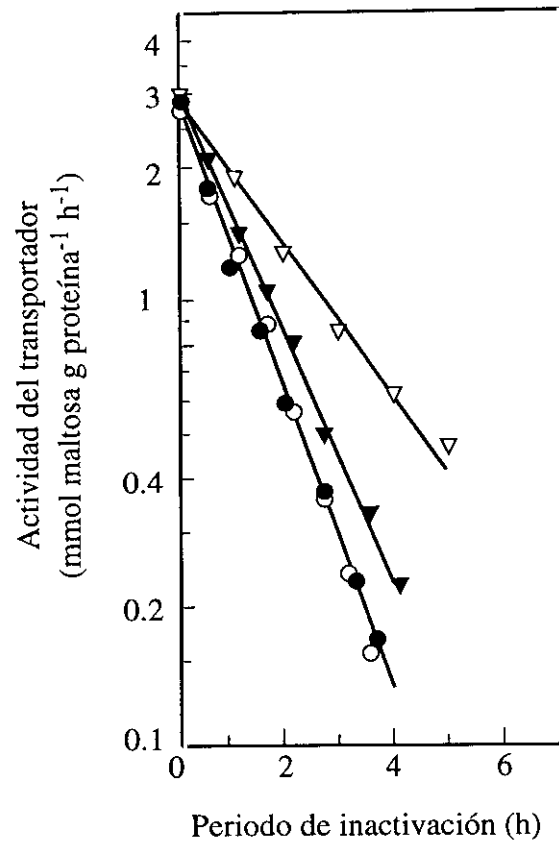
Estos resultados indicaron que la maltosa no sólo es capaz de sostener la inactivación de su propio transportador sino que, además, lo hace tan eficazmente como la glucosa (Figura 23).

### **IV.4. Inactivación del transportador en presencia de etanol o en ausencia de fuente de energía.**

Los resultados obtenidos hasta el momento indicaban que todos los sustratos fermentables ensayados eran capaces de sostener una inactivación rápida del transportador (Figuras 18, 21 y 23) mientras que el etanol, un sustrato no fermentable, inactivaba al



**Figura 22. Inactivación del transportador de maltosa en presencia de maltosa.** La cepa ATCC 42407 se cultivó y se trató como se describe en Figura 18. El medio de inactivación contenía 2% glucosa (○) o 2% maltosa (▽) como fuente de energía. A los tiempos indicados se recogieron alícuotas para valorar la actividad del transportador de maltosa. Los datos corresponden a la media de dos experimentos. Los resultados de los dos experimentos diferían en menos de un 10%.



**Figura 23. Efecto de la cicloheximida en la inactivación por maltosa del transportador de maltosa.**

La cepa ATCC 42407 se cultivó y se trató como se indica en Figura 18. El medio de inactivación contenía 2% glucosa (○, ●) o 2% maltosa (▽, ▼) como fuente de energía. Las suspensiones celulares se dividieron en dos alícuotas y, a una de ellas se añadió cicloheximida (●, ▼) para una concentración final 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . Los datos corresponden a la media de dos experimentos. Los resultados de los dos experimentos diferían en menos de un 10%.

transportador muy lentamente (Figura 24). Teniendo en cuenta estos hechos, nos pareció interesante investigar la inactivación del transportador en ausencia de un sustrato exógeno. Como se muestra en la Figura 24, en estas condiciones de ayuno el transportador se inactivó muy lentamente, a una velocidad semejante a la observada en presencia de etanol. También en este caso la vida media para el transportador resultó ser >10 horas.

En resumen, los resultados obtenidos sugerían que la inactivación rápida del transportador requiere la presencia de una fuente exógena de energía fermentable. Sugerían además que la glucosa, fructosa, manosa y maltosa son igualmente eficaces sosteniendo la inactivación mientras que, la galactosa es algo menos eficaz.

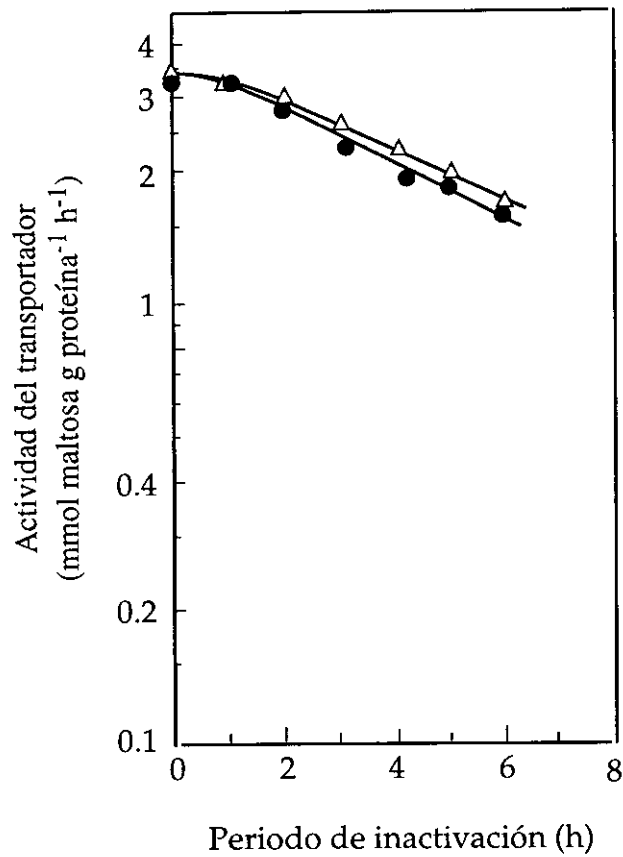
#### **IV.5. Correlación entre la inactivación y la degradación del transportador.**

Hemos mostrado más arriba (Figuras 8 y 9) que la inactivación por glucosa del transportador de maltosa es debida a su degradación. Sin embargo, resultados obtenidos en otro laboratorio (87) sugieren que, en el caso de algunas cepas, el transportador se inactiva sin que tenga lugar su degradación y se ha propuesto que esta inactivación podía ser debida a una fosforilación de la proteína (87). Para establecer si en nuestros experimentos la inactivación del transportador iba o no seguida de su degradación realizamos una estimación del contenido celular de transportador utilizando los anticuerpos policlonales anti-transportador descritos más arriba. Los resultados obtenidos mostraron que, en todos los casos, la vida media del transportador calculada midiendo la intensidad de la banda obtenida en los experimentos de inmunodetección (Figuras 25C y 25D) fue similar a la obtenida midiendo actividad (Figuras 18, 21, 23 y 24). Estos resultados permiten concluir que, en nuestros experimentos, la inactivación del transportador fue seguida de su degradación.

#### **IV.6. Relación entre la velocidad de inactivación, la velocidad de fermentación y la energía producida en el catabolismo.**

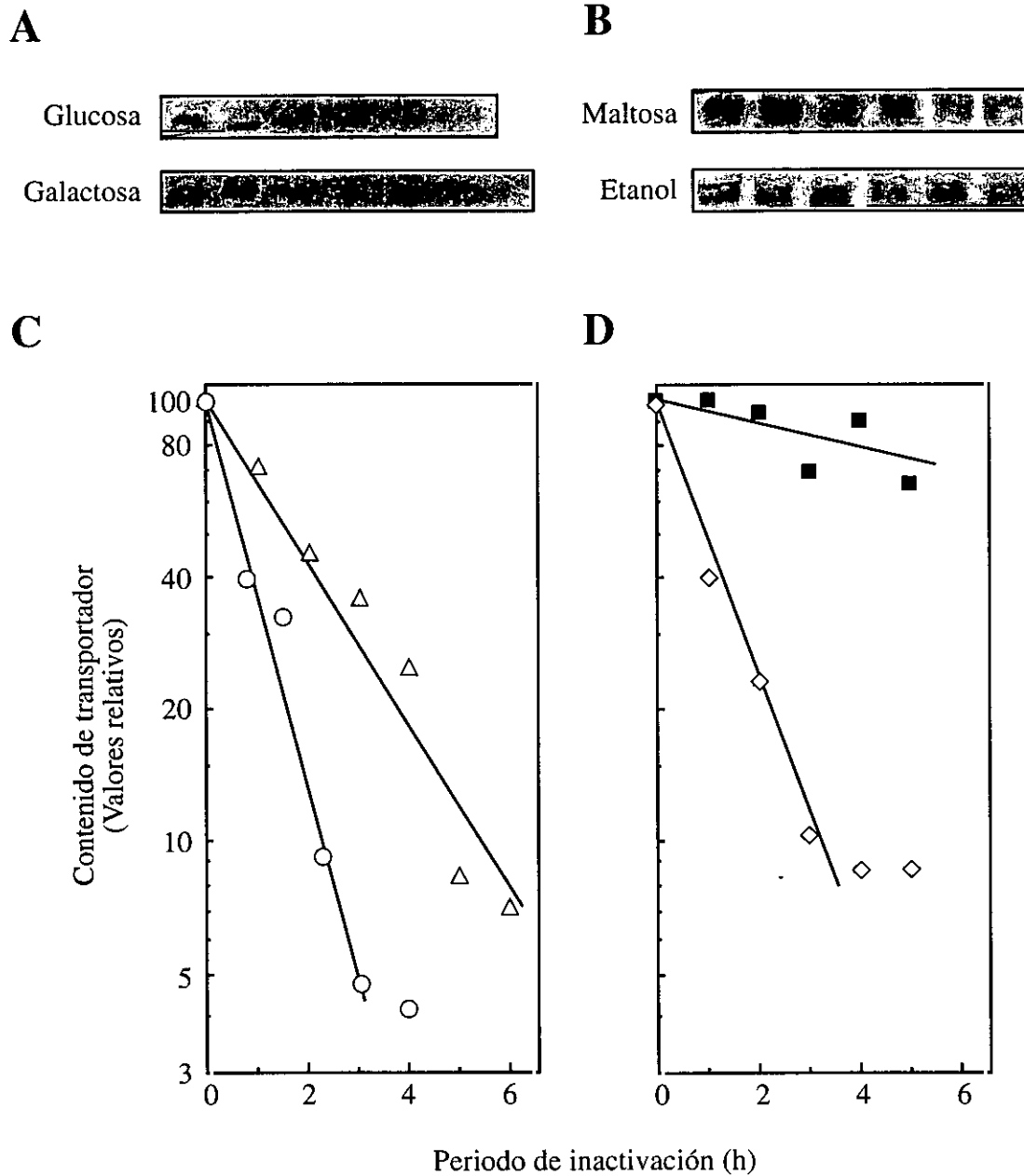
Como ya hemos mostrado, la glucosa, la fructosa, la manosa, y la maltosa sostienen la inactivación rápida del transportador con mayor eficacia que la galactosa (Figuras 18, 21 y 23). Este orden de eficacia coincide con la velocidad con que estos sustratos son fermentados por la levadura (75). Esta observación, y el hecho de que una fuente de energía no fermentable, etanol, no fuese capaz de sostener la inactivación (Figura 24), sugería que la velocidad de inactivación del transportador podía venir determinada por la velocidad de fermentación del sustrato presente en el medio. Con el fin de investigar esta posibilidad, medimos la velocidad de fermentación durante la inactivación en presencia de glucosa, maltosa y galactosa. Observamos que esta velocidad disminuyó durante un periodo de tiempo en el que la velocidad de inactivación del transportador permaneció constante (ver Tabla 2 y Figuras 18 y 23). Particularmente relevante fue el hecho de que, como puede





**Figura 24. Inactivación del transportador de maltosa en presencia de etanol o en ausencia de fuente de carbono.**

La cepa ATCC 42407 se recogió durante la fase exponencial de crecimiento. Tras lavar las células con agua, se suspendieron en el medio de inactivación en ausencia de fuente de energía (●) o en presencia de etanol como fuente de energía (Δ). Los datos corresponden a la media de dos experimentos. Los resultados de los dos experimentos diferían en menos de un 10%.



**Figura 25. Degradación del transportador de maltosa en presencia de diferentes fuentes de carbono.**

Las cepas X106-3D (*gal 80*) (A y C) y ATCC 42407 (B y D) se trataron como se indica en la Figura 18. El medio de inactivación contenía 2% glucosa (○), 2% galactosa (Δ), 2% maltosa (◇) o 2% etanol (■) como fuente de energía. En el caso del medio conteniendo maltosa se añadió cicloheximida para una concentración final 10  $\mu\text{g/ml}$  (Ver Resultados 4.3). A y B: Alícuotas de extractos crudos obtenidos a los tiempos indicados se analizaron por inmunoensayo utilizando los anticuerpos frente al transportador de maltosa.

C y D: Las intensidades de las bandas del transportador se midieron como se describe en Métodos y se representaron frente al periodo de inactivación.

verse en la Figura 23, en presencia de maltosa la velocidad de inactivación permanecía constante cuando la velocidad de fermentación había disminuido más de un 70% (Tabla 2). Esta disminución en la velocidad de fermentación durante la inactivación ya ha sido descrita previamente y ha sido atribuida a la disminución del transporte de este azúcar que tiene lugar durante el ayuno de fuente de nitrógeno (78). En conclusión, estos resultados sugieren que la velocidad de inactivación no está determinada por la velocidad de fermentación.

Hemos demostrado que la inactivación del transportador va seguida de su degradación (Figura 25) en la vacuola tras su internalización por endocitosis (101). Dado que varias etapas de la endocitosis de proteínas de membrana plasmática requieren energía, por ejemplo la unión de Ub (12, 86), la formación de endosomas (82), y la fusión de estos con la vacuola (98), la velocidad de inactivación podía venir determinada por la concentración de ATP en las células. Para probar esta posibilidad, medimos la concentración intracelular de ATP a distintos tiempos de inactivación. Como puede verse en la Tabla 3, la concentración de este metabolito fue similar en el caso de todos los sustratos ensayados, incluso en el caso del etanol que inactivó al transportador con una velocidad mucho menor que el resto de sustratos ensayados.

Alternativamente, la velocidad de inactivación podía estar relacionada no con los niveles de ATP, sino con la velocidad con que se produce este metabolito. Para explorar esta posibilidad, calculamos el valor teórico de la velocidad de producción de ATP a partir de los datos de fermentación y respiración obtenidos en los experimentos descritos más arriba (Tabla 3). Los resultados obtenidos sugieren que no existe relación directa entre la velocidad de producción de ATP y la velocidad de inactivación del transportador. Particularmente relevante fue el hecho de que, en presencia de maltosa, la velocidad de inactivación permaneció constante (Figura 23) cuando la velocidad de producción de ATP disminuyó más de un 40% (Tabla 3).

A pesar de estos resultados, la posibilidad de que la velocidad de obtención de energía determine la velocidad de inactivación no puede ser descartada ya que, en el cálculo teórico de la velocidad de producción de ATP (Tabla 3) hemos considerado una constante P:O de 2 y actualmente hay evidencia de que el rendimiento energético de la cadena respiratoria puede cambiar en función de numerosos factores (116).

**Tabla 2. Velocidad de fermentación y de respiración durante la inactivación.**

Periodo de inactivación (h)	Cepa ATCC 42407				Cepa X106-3D			
	Fermentación (mmol hexosa g proteína <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )		Respiración (mmol hexosa g proteína <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )		Fermentación (mmol hexosa g proteína <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )		Respiración (mmol hexosa g proteína <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )	
	Glucosa	Maltosa	Glucosa	Maltosa	Glucosa	Galactosa	Glucosa	Galactosa
0.5	24	22	1.0	1.1	20	12	0.50	0.42
1.0	22	16	0.95	1.1	20	12	0.49	0.48
1.5	19	12	1.0	1.2	19	11	0.49	0.45
2.0	17	9	1.1	1.2	18	10	0.50	0.43
2.5	16	7	1.0	1.1	18	10	0.50	0.45

Las cepas ATCC 42407 y X106-3D se cultivaron y se suspendieron en el medio de inactivación conteniendo glucosa, maltosa o galactosa como se indica en Figura 18. En el caso del medio conteniendo maltosa se añadió cicloheximida para una concentración final 10 µg/ml. La velocidad de fermentación se calculó considerando que 1 mol de hexosa fermentada produce 2 moles de CO<sub>2</sub> y la de respiración considerando que 1 mol de hexosa respirada consume 6 moles de O<sub>2</sub>. Los datos corresponden a la media de dos experimentos. Los resultados de los dos experimentos diferían en menos de un 10%.

**Tabla 3. Contenido intracelular de ATP y valor teórico de producción de ATP en el catabolismo durante la inactivación.**

Periodo de inactivación (h)	Cepa ATCC 42407						Cepa X106-3D			
	Concentración de ATP (mM)			Producción de ATP (mmol g proteína <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )			Concentración de ATP (mM)		Producción de ATP (mmol g proteína <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )	
	Glucosa	Maltosa	Etanol	Glucosa	Maltosa		Glucosa	Galactosa	Glucosa	Galactosa
0.5	1.2	1.1	1.1	72	70		1.1	1.1	52	34
1.0	ND	ND	ND	67	58		ND	ND	52	36
1.5	1.2	1.2	1.0	62	53		1.1	1.2	50	33
2.0	ND	ND	ND	60	47		ND	ND	48	30
2.5	1.2	1.2	1.1	56	40		1.1	1.2	48	31

Las células se crecieron y se trataron como en Tabla 2. La concentración intracelular de ATP se determinó como se describe en Métodos. Los datos corresponden a la media de dos experimentos. Los resultados de los dos experimentos diferían en menos de un 10%. ND significa no determinado. La velocidad de producción de ATP se calculó a partir de los datos de fermentación y respiración mostrados en la tabla 2, considerando que 1 mol de hexosa fermentada produce 2 moles de ATP y suponiendo que 1 mol de hexosa respirada produce 24 moles de ATP.

***DISCUSIÓN***

## DISCUSIÓN

La levadura *S. cerevisiae* se encuentra en la naturaleza principalmente en hábitats de origen vegetal ricos en azúcares. Desde estos hábitats, la levadura puede ser transportada por agentes como el aire o insectos a otros hábitats más pobres y por tanto más hostiles para su desarrollo. De esto se deduce que la supervivencia de la levadura, como la de otros muchos organismos, está íntimamente ligada a su capacidad de adaptarse a los cambios nutricionales y a los distintos tipos de estrés que ocurren en el medio que la rodea. Una situación de estrés muy frecuente en la naturaleza es la producida por el ayuno de algún nutriente y muy a menudo en el caso de la levadura el nutriente limitante es el amonio. Las situaciones de estrés producen diversas respuestas en las células y algunas de estas respuestas son comunes a todos los tipos de estrés mientras que otras son más específicas. Ambos tipos de respuestas suscitan un gran interés, tanto desde un punto de vista científico como desde un punto de vista económico.

En levadura, el estrés producido por la carencia de nutrientes da lugar a una reorganización del metabolismo celular que es regulada por diferentes tipos de mecanismos y que implica cambios en la dotación enzimática de la célula. Así, el estrés producido por el ayuno de amonio origina la inactivación de un cierto número de proteínas de membrana plasmática como son los transportadores de azúcares y de otros nutrientes (8, 14, 25, 102, 135). Esta pérdida de actividad de las proteínas de membrana puede ser debida a cambios en su estado conformacional o a modificaciones covalentes como la fosforilación. Estos cambios son generalmente reversibles. También cabe la posibilidad de que la inactivación de estas proteínas sea debida a su degradación. Obviamente en este caso el proceso es irreversible. Nosotros hemos mostrado en este trabajo que la inactivación del transportador de maltosa que tiene lugar durante el ayuno de fuente de nitrógeno cuando se halla presente glucosa es irreversible y debida a su degradación. Ahora también sabemos que la degradación de esta proteína tiene lugar en la vacuola, tras ser internalizada por endocitosis, en un proceso que ocurre independientemente de la función del proteasoma (101).

La inactivación y degradación en vacuola tras endocitosis durante el ayuno de una fuente de nitrógeno parece ser un mecanismo de regulación que afecta a muchas proteínas de membrana plasmática. Posteriormente a nuestro trabajo se ha visto que, el transportador de galactosa (59), el de uracilo (135) y los transportadores Hxt6 y Hxt7 de glucosa (71) son también degradados en vacuola en estas condiciones nutricionales. También se ha visto que otros estados nutricionales pueden provocar la degradación específica de otras proteínas. Así, se sabe que la adición de amonio a células que están creciendo en presencia de aminoácidos provoca la endocitosis y degradación en vacuola del transportador general de aminoácidos (46). Es interesante señalar que independientemente del factor desencadenante, la degradación en vacuola de las proteínas de membrana plasmática en levadura parece ser una regla general ya que, que nosotros sepamos, la única excepción

conocida a esta regla es la degradación del transportador de cobre. Esta proteína es degradada en la propia membrana plasmática cuando la concentración de cobre en el medio es elevada (92), probablemente por la acción de una (o varias) proteasa(s) específica(s) que no afecta(n) a otras proteínas de membrana. De todos estos hechos se deduce que la endocitosis juega un papel muy importante en la remodelación de la membrana plasmática en este organismo, remodelación que es necesaria para su adaptación a los cambios nutricionales.

Desde hace algún tiempo se sabe que determinadas secuencias de aminoácidos confieren inestabilidad a las proteínas citosólicas, lo que las hace susceptibles de ser degradadas por el proteasoma. Estas secuencias se conocen como señales de degradación y también con el término inglés "degrons" (131). En levadura, la primera señal que se identificó y también la mejor estudiada es la denominada "N-degron", que hace referencia al aminoácido N-terminal de la proteína (4, 132). El estudio de esta señal de degradación ha dado lugar al establecimiento de una regla, conocida como "N-end rule", que relaciona la inestabilidad de una proteína, es decir su vida media, con el aminoácido presente en su extremo amino (133). Se ha visto que la "N-end rule" se cumple en todos los sistemas estudiados: animales, plantas, bacterias y levadura (62), si bien los aminoácidos que originan mayor inestabilidad en levadura pueden proporcionar estabilidad en otros organismos (132, 133). En eucariotas, el "N-degron" de una proteína comprende, al menos, una lisina interna y un aminoácido N-terminal que confiera inestabilidad. El aminoácido desestabilizante actuaría como un sitio de reconocimiento para una enzima E3 de la vía de la Ub (la enzima Ubr1p) (6) y la lisina como aceptora de una Ub (18) que le sería transferida desde una enzima E2 (la UBC2p) (27). Una propiedad interesante de la doble señalización es que el motivo de reconocimiento y la lisina aceptora de Ub pueden estar separadas, incluso en diferentes subunidades si la proteína es oligomérica (62, 132).

Otra señal de degradación bien caracterizada en levadura es una secuencia consenso de 9 aminoácidos conocida como "destruction box" que es necesaria para la degradación de ciclinas (41). Todas las ciclinas que se conocen contienen en su extremo carboxilo secuencias ricas en lisinas que podrían actuar como sitios de unión a Ub. Aunque no se conoce el mecanismo de esta unión, se cree que es similar al de la unión a los sustratos de la vía "N-end rule". También está bien establecido que secuencias ricas en prolina (P), ácido glutámico (E), serina (S) y treonina (T), en cualquier orden o combinación, limitadas por aminoácidos básicos actúan como señales para la degradación de proteínas de vida media corta. Este tipo de secuencias se conocen como regiones PEST y también están implicadas en la degradación de proteínas por la vía de la Ub (100). Además, se ha descrito que la fosforilación de alguna(s) de las serinas o treoninas de esta región puede ser necesaria para la unión de Ub a la proteína y por tanto para su degradación (100, 103).

En lo que se refiere a las proteínas de membrana plasmática, se sabe que, tanto en células de mamíferos como de levadura, determinadas secuencias situadas en los dominios



citósolicos de estas proteínas actúan como señales para endocitosis. En células de mamíferos algunas de estas secuencias están basadas en motivos tirosina o di-leucina (73, 128). En levadura, se ha visto que la secuencia SINNDKSS contenida en el receptor del factor- $\alpha$  es necesaria para su internalización (52, 106) y más recientemente se ha descrito que el receptor del factor- $\alpha$  y la uracil permeasa contienen una secuencia PEST que es requerida para su internalización (83, 109). Este último transportador contiene además un motivo similar a la "destruction box" de las ciclinas (35).

La endocitosis de proteínas de membrana puede también estar regulada por procesos de fosforilación/defosforilación. Se ha visto que la endocitosis del transportador de uracilo y del receptor del factor- $\alpha$  tiene lugar tras su fosforilación (59, 83, 108) y también que la endocitosis del transportador general de aminoácidos, que en su forma activa se encuentra fosforilado, parece ser desencadenada por defosforilación (123). Aparentemente, también el transportador de maltosa se encuentra fosforilado en determinadas condiciones fisiológicas y se ha llegado a proponer que este hecho podría estar implicado en su endocitosis (87).

Nuestros resultados han mostrado que la unión de Ub al transportador de maltosa es necesaria para su internalización. Esta conclusión se basa en la observación de que, en condiciones de endocitosis, el transportador permanece en la membrana cuando las células son deficientes en la ubiquitín-proteína ligasa Npi1 o en la ubiquitín-hidrolasa Doa4, dos enzimas de la vía de la Ub (47, 94). En el caso de las células deficientes en ubiquitín-proteína ligasa Npi1 se observa una cierta internalización del transportador, aproximadamente un 30% de la observada en la cepa silvestre isogénica. Este hecho es probablemente debido a la actividad residual Npi1p presente en las células. Consistente con esta posibilidad es el hecho de que las células deficientes en ubiquitín-hidrolasa Doa4, que no presentan ninguna actividad Doa4p, tampoco presentan ninguna actividad endocítica. Resultados de otros laboratorios indican que estas dos enzimas son también necesarias para la internalización del transportador de uracilo y de la permeasa general de aminoácidos (34, 47, 122). Por lo tanto, parece bien probado que la Ub, considerada durante mucho tiempo como una señal exclusiva para la degradación de proteínas citosólicas por el proteasoma 26S (54, 99), puede actuar también como señal para la internalización y degradación de proteínas de membrana plasmática en vacuola.

La implicación de Npi1p en la internalización del transportador de maltosa es consistente con el papel atribuido a las ubiquitín-proteína ligasas, esto es, la transferencia de Ub a las proteínas sustrato. Así mismo, la implicación de Doa4p en la internalización es consistente con el principal papel atribuido a las ubiquitín-hidrolasas, esto es, la recuperación de Ub libre para su utilización en un nuevo ciclo. De acuerdo con esta función, era de esperar que la falta de esta ubiquitín-hidrolasa, la más importante en levadura (94), diera lugar a una considerable disminución del nivel de Ub libre en la célula y, en consecuencia, a una inhibición de los procesos que dependen de Ub, como es el caso de la endocitosis de nuestro transportador. Sin embargo, según los autores que aislaron y

caracterizaron la cepa *Δdoa4*, la cantidad de Ub en estas células mutantes no estaba sensiblemente disminuida y además, los defectos originados por la ausencia de la enzima no eran revertidos por la sobreexpresión de Ub (94). Estos resultados parecían descartar que la inhibición de la endocitosis en estas células fuera debida a la carencia de Ub libre. Sin embargo, los resultados presentados en este trabajo muestran: i) que la cantidad de Ub disponible en el mutante *Δdoa4* sí que está sustancialmente reducida con respecto a la cepa silvestre y ii) que en la cepa mutante, la endocitosis sí que se restablece cuando se sobreexpresa Ub. Resultados similares se han encontrado para la endocitosis de la uracil permeasa y de la permeasa general de aminoácidos (33, 122) y por todo ello, concluimos que la inhibición de la internalización del transportador de maltosa en la cepa *Δdoa4* es una consecuencia de la carencia de Ub libre en estas células.

El hecho de que la Ub actúe como señal tanto para la degradación de proteínas citosólicas en el proteasoma 26S (21) como para la internalización de proteínas de membrana plasmática que se degradan en la vacuola (51) plantea la pregunta de cómo estos dos sistemas de degradación reconocen sus respectivos sustratos. Este reconocimiento selectivo podría venir determinado por diferentes tipos de modificación por Ub. Se sabía que la señal para la degradación de proteínas citosólicas consistía en la formación de cadenas de, al menos, 4 moléculas de Ub unidas a través de Lys-48. Además, se había postulado que la "mono-ubiquitinación" de proteínas de membrana plasmática, definida como la unión de una molécula de Ub a una o más lisinas de la proteína sustrato, podría ser la "unidad básica" requerida para su internalización. Este postulado se basaba en el hecho de que la sobreexpresión en células carentes de Ub libre de una Ub mutada incapaz de formar cadenas es suficiente para desencadenar la internalización de todas las proteínas investigadas (33, 127, 122).

También se había demostrado que esta "unidad básica" es suficiente para conseguir la máxima velocidad de internalización del receptor del factor- $\alpha$  (127) mientras que no lo es en el caso de otras proteínas, como la uracil permeasa y el transportador general de aminoácidos. En este caso, la máxima velocidad de internalización sólo se conseguía si, a partir de la "unidad básica", se formaban cadenas de Ub a través de la Lys-63 (33, 122).

Estas diferencias en los requerimientos para la internalización de estas dos proteínas podían estar relacionadas con la diferencia en su tamaño molecular y en su número de TMS. Así, se había propuesto que en el caso de proteínas de menor tamaño molecular y menor número de TMS como el receptor del factor- $\alpha$  (7-TMS y unos 48 kDa), la "mono-ubiquitinación" sería suficiente para interaccionar con la maquinaria endocítica mientras que, en el caso de las proteínas de mayor tamaño molecular y mayor número de TMS como el transportador general de aminoácidos y el de uracilo (12-TMS y unos 70 kDa), la interacción podría requerir la formación de cadenas de Ub, bien por razones estéricas bien por la conveniencia de disponer de más sitios de unión (127). Sin embargo, nuestros resultados descartan esta hipótesis ya que muestran que la máxima velocidad de

internalización del transportador de maltosa, otra proteína de gran tamaño y número de TMS (12-TMS y 68 kDa), no requiere la formación de cadenas de Ub. Este hecho sugiere que, a diferencia de lo que se había propuesto, la "mono-ubiquitinación" no es una necesidad específica de la internalización de proteínas de 7-TMS así como tampoco es una necesidad la formación de cadenas de Ub para la internalización a máxima velocidad de las proteínas de 12-TMS.

Hay evidencia de que la formación en una determinada proteína de un tipo específico de cadena de Ub viene determinada por la ubiquitín-proteína conjugasa (enzima E2) y la ubiquitín-proteína ligasa (enzima E3) que intervienen en el proceso (3, 62, 63). Así, se ha visto que la participación conjunta de las enzimas *ubc4p-ubc5p* (E2) y *Ufd4p* (E3) da lugar a la formación de cadenas de Ub a través de Lys-29 en sustratos de la vía "UFD" (63). También que la enzima *Rad6* (E2) interacciona físicamente con la enzima *Ubr1* (E3) y el complejo resultante juega un papel en la formación de cadenas a través de Lys-48 en sustratos de la vía "N-end rule" (27, 133). En el caso de cadenas a través de la Lys-63, se ha especulado que su formación sobre proteínas de membrana plasmática podría resultar de la participación de la enzima *Npi1p* (E3) y de una enzima E2 aún no identificada (33, 122). Esta hipótesis está basada en la observación de que la internalización del transportador de uracilo y de la permeasa general de aminoácidos, que son estimuladas por la formación de cadenas a través de Lys-63, requieren la enzima *Npi1p* (E3) (33, 34, 121, 122). Sin embargo, el hecho de que como se muestra en este trabajo, la internalización del transportador de maltosa, que no es estimulada por la formación de cadenas a través de Lys-63, también requiera esta enzima E3 parece descartar esta posibilidad.

A pesar de los avances realizados en el conocimiento de las señales de degradación de proteínas de membrana y en el papel que juega la Ub en esta degradación es obvio que el conocimiento sobre este proceso dista mucho de ser completo. También parece obvio que la degradación de estas proteínas, es decir su inactivación, es un proceso fundamental para la adaptación de la levadura a los cambios nutricionales puesto que, en definitiva, es responsable de la remodelación de la membrana plasmática. Se ha visto que el ayuno de una fuente de nitrógeno desencadena la inactivación de los transportadores de azúcares cuando se halla presente la glucosa y se viene asumiendo que esta inactivación, conocida como "inactivación catabólica" es un mecanismo específico de regulación que favorece el uso preferencial de glucosa. Sin embargo, los resultados presentados en este trabajo y otros resultados, obtenidos tanto en nuestro laboratorio como en otros laboratorios, ponen en tela de juicio esta suposición. Aparentemente la así llamada "inactivación catabólica" de las proteínas de membrana plasmática no presenta ningún tipo de especificidad puesto que es desencadenada y sostenida por azúcares diferentes de la glucosa, en ocasiones con una eficacia similar a la glucosa (esta tesis). Además, esta inactivación no es específica de los transportadores de azúcares puesto que, que nosotros sepamos, todas las proteínas de membrana plasmática ensayadas, como la  $H^+$ -ATPasa (7), el transportador de K (8) o la

uracil permeasa (135) e incluso algunos de los propios transportadores de glucosa, como el Hxt6 y el Hxt7 (14, 71) muestran este tipo de inactivación. Una inespecificidad como ésta no parece previsible en un mecanismo específico de regulación, razón por la cual nosotros desestimamos esta posibilidad.

Si la "inactivación catabólica" no es un mecanismo específico de regulación, ¿qué es entonces?. Se sabe que la inactivación de las proteínas de membrana ocurrida durante el ayuno de fuente de nitrógeno es debida a su degradación en la vacuola (59, 101, 120, 135). También se sabe que el ayuno de fuente de nitrógeno es uno de los principales factores que estimulan el recambio de proteínas (9). Nosotros proponemos que la inactivación de los transportadores de azúcares, así como la inactivación de otras proteínas de membrana, en estas condiciones de ayuno es debida a la estimulación del recambio de proteínas que provoca la ausencia de este nutriente. Una inactivación como ésta permitiría adecuar la composición proteica de la membrana a la nueva condición nutricional y a la eventual aparición de nuevos nutrientes. Además, contribuiría a proporcionar los aminoácidos requeridos para la respuesta al estrés. Una predicción de esta hipótesis es que una inactivación por glucosa como la descrita no debería tener lugar durante el crecimiento celular y resultados preliminares de nuestro laboratorio parecen estar de acuerdo con esta predicción.

Que la inactivación, además del ayuno de fuente de nitrógeno, requiera la presencia de una fuente de energía fermentable se comprende fácilmente si se tiene en cuenta que varias etapas de la endocitosis, como la unión de Ub, la formación de endosomas o la fusión de éstos con la vacuola, requieren energía (12, 82, 86, 98) Sin embargo, no resulta evidente la razón por la cual la velocidad de inactivación varía en función de la fuente de energía presente. Pero, tampoco está claro por qué otros procesos celulares que también requieren energía también varían dependiendo de este factor. Por ejemplo, la velocidad de crecimiento y la cantidad de masa celular de levadura producida a partir de un sustrato son dos procesos celulares que cambian con la fuente de energía presente en el medio (37). Como en el caso de la inactivación, una correlación entre estos dos procesos y/o la concentración celular de ATP y la producción teórica de ATP en el catabolismo no es evidente. A pesar de ello, se cree que tanto la velocidad de crecimiento como la cantidad de masa celular producida a partir de un sustrato dependen de la velocidad y cantidad de ATP producida en el catabolismo (37). Una dependencia similar puede ser también intuitiva en el caso de la inactivación del transportador de maltosa pero, de momento, la demostración de este hecho no es fácil ya que a pesar de los progresos realizados en el conocimiento sobre el control y el rendimiento energético de la cadena respiratoria, aún no ha sido posible establecer con márgenes de seguridad aceptables cual es la producción de ATP en levadura *in vivo* (116). Tal vez en un futuro no lejano éste y otros aspectos de la fisiología de la levadura, como los tratados en este trabajo, puedan ser clarificados.

***CONCLUSIONES***

## CONCLUSIONES

1. La inactivación del transportador de maltosa ocurrida durante el ayuno de fuente de nitrógeno en presencia de glucosa, conocida en la literatura como "inactivación catabólica", es debida a la degradación del transportador. Resultados posteriores, también obtenidos en nuestro laboratorio, han demostrado que la degradación de esta proteína tiene lugar en la vacuola tras su internalización por endocitosis.

2. La endocitosis del transportador de maltosa, es decir su "inactivación catabólica", requiere dos enzimas de la vía de la Ub: la ubiquitín-proteína ligasa Npi1/Rsp5 y la ubiquitín-hidrolasa Npi2/Doa4. Ambas enzimas intervienen en la etapa de internalización del transportador. La unión de Ub al transportador parece actuar como una señal de endocitosis.

3. La "mono-ubiquitinación", definida como la unión de una molécula de Ub a una o más lisinas del transportador, es suficiente para desencadenar su máxima velocidad de internalización.

4. La formación de cadenas de Ub a través de su Lys-63 no es, como se ha postulado, un requerimiento general de la endocitosis de proteínas de 12-TMS puesto que el transportador de maltosa, que tiene 12-TMS, no requiere la formación de estas cadenas. Tampoco la "mono-ubiquitinación" es una característica peculiar de las proteínas de 7-TMS puesto que el transportador de maltosa, que no tiene 7-TMS, presenta esta modificación.

5. La "inactivación catabólica" del transportador de maltosa no es producida específicamente por glucosa. Otros azúcares inactivan al transportador con la misma eficacia que la glucosa. Proponemos que esta inactivación, ocurrida durante el ayuno de una fuente de nitrógeno, no es un mecanismo específico de regulación sino el resultado de la estimulación del recambio de proteínas que tiene lugar en esa condición nutricional.

***BIBLIOGRAFÍA***

**BIBLIOGRAFÍA**

1. **Arnason, T. & Ellison, M. J.** (1994) Stress resistance in *Saccharomyces cerevisiae* is strongly correlated with assembly of a novel type of multiubiquitin chain. *Mol. Cell. Biol.* 14, 7876-7883
2. **Authier, F., Posner, B. I. & Bergeron, J. J. M.** (1996) Endosomal proteolysis of internalized proteins. *FEBS Lett.* 389, 55-60
3. **Baboshina, O. V. & Haas, A. L.** (1996) Novel multiubiquitin chain linkages catalyzed by the conjugating enzyme E2epf and RAD6 are recognized by 26S proteasome subunit. *J. Biol. Chem.* 271, 2823-2831
4. **Bachmair, A., Finley, D. & Varshavsky, A.** (1986) In vivo half-life of a protein is a function of its amino-terminal residue. *Science* 234, 179-186
5. **Barnet, J. A.** (1997) Yeast sugar metabolism. II. Sugar utilization by *Saccharomyces cerevisiae*. , Zimmermann, F.K. Entian, K.D., 35-42 pp
6. **Bartel, B., Wunning, I. & Varshavsky, A.** (1990) The recognition component of the N-end rule pathway. *EMBO J.* 9, 3179-3189
7. **Benito, B., Moreno, E. & Lagunas, R.** (1991) Half-life of the plasma membrane ATPase and its activating system in resting yeast cells. *Biochim. Biophys. Acta* 1063, 265-268
8. **Benito, B., Riballo, E. & Lagunas, R.** (1991) Turnover of the K<sup>+</sup> transport system in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* 294, 35-37
9. **Betz, H.** (1976) Inhibition of protein synthesis stimulates intracellular protein degradation in growing cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 72, 121-130
10. **Birnboim, H. C.** (1983) A rapid alkaline extraction method for the isolation of plasmids ADN. *Methods Enzymol.* 68, 245-267
11. **Boles, F. & Hollenberg, C. P.** (1997) The molecular genetics of hexose transport in yeast. *FEMS Microbiol. Rev.* 21, 85-111
12. **Bonifacino, J. S. & Weissman, A. M.** (1998) Ubiquitin and the control of protein fate in the secretory and endocytic pathways. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 14, 19-57
13. **Busturia, A. & Lagunas, R.** (1985) Identification of two forms of the maltose transport system in *Saccharomyces cerevisiae* and their regulation by catabolite inactivation. *Biochim. Biophys. Acta* 820, 324-326
14. **Busturia, A. & Lagunas, R.** (1986) Catabolite inactivation of the glucose transport system in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Gen. Microbiol.* 132, 379-385
15. **Chang, Y. S., Dubin, R. A., Perkins, E., Michels, C. A. & Needleman, R. B.** (1989) Identification and characterization of the maltose permease in a genetically defined *Saccharomyces* strain. *J. Bacteriol.* 171, 6148-6154
16. **Charron, M. J., Dubin, R. A. & Michels, C. A.** (1986) Structural and functional analysis of the *MAL1* locus of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 6, 3891-3899
17. **Charron, M. J., Read, E., Haut, S. R. & Michels, C. A.** (1989) Molecular evolution of the telomere associated *MAL* loci of *Saccharomyces*. *Genetics* 122, 307-316



18. Chau, V., Tobias, J. W., Bachmair, A., Marriott, D., Ecker, D., Gonda, D. K. & Varshavsky, A. (1989) A multiubiquitin chain is confined to specific lysine in a targeted short-lived protein. *Science* 243, 1576-1583
19. Chen, D. C., Yang, B. C. & Kuo, T. T. (1992) One-step transformation of yeast in stationary phase. *Current Genetics* 21, 83-84
20. Cheng, Q. & Michels, C. A. (1989) The maltose permease encoded by *MAL61* gene of *Saccharomyces cerevisiae* exhibits both sequence and structural homology to the sugar transporters. *Genetics* 123, 477-484
21. Chiechanover, A. (1998) The ubiquitin-proteasome pathway: on protein death and cell life. *EMBO J.* 17, 7151-7160
22. Chiechanover, A. & Schwartz, A. L. (1998) The ubiquitin-proteasome pathway: the complexity and myriad functions of proteins death. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 95, 2727-2730
23. Chistianson, T. W., Sikorski, R. S., Dante, M., Shero, J. H. & Hieter, P. (1992) Multifunctional yeast high-copy-number shuttle vectors. *Gene* 110, 119-122
24. Cirillo, V. (1968) Galactose transport in *Saccharomyces cerevisiae*. I. Non-metabolizable sugars as substrates and inducers of the galactose transport system. *J. Bacteriol.* 95, 1727-1731
25. DeJuan, C. & Lagunas, R. (1986) Inactivation of the galactose transport system in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* 207, 258-261
26. Dice, J. F. & Goldberg, A. L. (1975) Relationship between *in vivo* degradative rates and isoelectric points of proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 72, 3893-3897
27. Dohmen, J. D., Madura, b., Barte, B. & Varshavsky, A. (1991) The N-end rule is mediated by the UBC2 (RAD6) ubiquitin-conjugating enzyme. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 88, 7351-7355
28. Ecker, D. J., Kham, M. I., Marsh, J., Butt, T. R. & Crooke, S. T. (1987) Chemical synthesis and expression of a cassette adapted ubiquitin gene. *J. Biol. Chem.* 262, 3524-3527
29. Egner, E. & Kuchler, K. (1996) The yeast multidrug transporter Pdr5 of the plasma membrane is ubiquitinated prior to endocytosis and degradation in the vacuole. *FEBS lett.* 378, 177-181
30. Egner, E., Mahé, Y., Pandjaitan, R. & Kuchler, K. (1995) Endocytosis and vacuolar degradation of the plasma membrane-localized Pdr5 ATP-binding cassette multidrug transporter in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 15, 5879-5887
31. Finley, D., Sadis, S., Monia, B. P., Boucher, P., Ecker, D. J., Crooke, S. T. & Chau, V. (1994) Inhibition of proteolysis and cell cycle progression in a multiubiquitination-deficient yeast mutant. *Mol. Cell. Biol.* August., 5501-5509
32. Funayama, S., Gancedo, J. M. & Gancedo, C. (1980) Turnover of yeast fructose-1,6-bisphosphatases in different metabolic conditions. *Eur. J. Biochem.* 109, 61-66
33. Galan, J. M. & Haguenaer-Tsapis, R. (1997) Ubiquitin Lys63 is involved in ubiquitination of a yeast plasma membrane protein. *EMBO J.* 16, 5847-5854
34. Galan, J. M., Moreau, V., André, B., Volland, C. & Haguenaer-Tsapis, R. (1996) Ubiquitination mediated by the Npi1p/Rsp5p ubiquitin-protein ligase is required for endocytosis of the yeast uracil permease. *J. Biol. Chem.* 271, 10946-10952

35. Galan, J. M., Volland, C., Urbal-Grimal, D. & Haguenaer-Tsapis, R. (1994) The yeast plasma membrane uracil permease is stabilized against stress induced degradation by a point mutation in a cyclin-like "destruction box". *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 201, 769-775
36. Gamo, F. J., Moreno, E. & Lagunas, R. (1995) The low-affinity component of the glucose transport system in *Saccharomyces cerevisiae* is not due to passive diffusion. *Yeast* 11, 1393-1398
37. Gancedo, C., Serrano, R. (1988) Energy-yielding metabolism. In: The yeasts (Harrison, J. S., Rose, H. A. Eds.) 3, 205-259. Academic Press, New York.
38. Gancedo, J. M. (1992) Carbon catabolite repression in yeast. *Eur. J. Biochem.* 206, 297-313.
39. Gancedo, J. M. & Gancedo, C. (1997) Gluconeogenesis and catabolite inactivation. In: *Yeast sugar metabolism*. Edited by Zimmermann, F.K. and Entian, K. D. 359-377
40. Gancedo, J. M., López, S. & Ballesteros, F. (1982) Calculations of half-lives of proteins *in vivo*. Heterogeneity in the rate of degradation of yeast proteins. *Mol. Cell. Biochem.* 43, 89-95
41. Glotzer, M., Murray, A. W. & Kirschner, M. W. (1991) Cyclin is degraded by the ubiquitin pathway. *Nature* 349, 132-138
42. Han, E. K., Cotty, F., Sottas, C., Jiang, H., Michels, C. (1995) Characterization of *AGT1* encoding a general  $\alpha$ -glucoside-transporter from *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Microbiol.* 17, 1093-1107
43. Hanahan, D. (1986) Techniques for transformation of *E. coli*. In: *ADN cloning I* (Glover, D. M., ed.) IRL Press, Oxford, 109-135
44. Hare, J. F. (1990) Mechanisms of membrane protein turnover. *Biochim. Biophys. Acta.* 1031, 71-90
45. Hashimoto, H., Kikuchi, Y., Nogoy, Y. & Fukasawa, T. (1983) Regulation of expression of the galactose gene cluster in *Saccharomyces cerevisiae*. Isolation and characterization of the regulatory gen *GAL4*. *Mol. Gen. Genet.* 191, 31-38
46. Hein, C. & André, B. (1994) The general amino acid permease Gap1 is degraded during nitrogen catabolite inactivation: mutations affecting the carboxyterminus of Gap1 make it resistant to triggered degradation. In: *Proc. 12th Small Meeting on Yeast Transport and Energetics*. Karpacz, Poland,
47. Hein, C., Springael, J. Y., Volland, C., Haguenaer-Tsapis, R. & André, B. (1995) *NP11*, an essential yeast gene involved in induced degradation of Gap1 and Fur4 permeases, encodes the Rsp5 ubiquitin-protein ligase. *Mol. Microbiol.* 18, 77-87
48. Heinemeyer, W., Kleinschmidt, J. A., Saidowsky, J., Escher, C. & Wolf, D. H. (1991) Proteinase yscE, the yeast proteasome/multicatalytic-multifunctional proteinase: mutants unravel its function in stress induced proteolysis and uncover its necessity for cell survival. *EMBO J.* 10, 555-562
49. Heredia, C. F., Sols, A. & DelaFuente, G. (1968) Specificity of the constitutive hexose transport in yeast. *Eur. J. Biochem.* 5, 321-329
50. Hersko, A. & Chiechanover, A. (1992) The ubiquitin system for protein degradation. *Annu. rev. Biochem.* 61, 761-807

51. Hicke, L. (1999) Gettin' down with ubiquitin: turning off cell-surface receptors, transporters and channels. *Trends Cell Biol.* 9, 107-112
52. Hicke, L. & Riezman, H. (1996) Ubiquitination of a yeast plasma membrane receptor signals its ligand-stimulated endocytosis. *Cell* 84, 277-87
53. Hilt, W. & Wolf, D. H. (1992) Stress-induced proteolysis in yeast. *Mol. Microbiol.* 6, 2437-2442
54. Hochstrasser, M. (1995) Ubiquitin, proteasomes, and regulation of intracellular protein degradation. *Curr. Opin. Cell Biol.* 7, 215-223
55. Hochstrasser, M. (1996) Protein degradation or regulation: Ub the judge. *Cell* 84, 813-815
56. Hochstrasser, M., Ellison, M. J., Chau, V. & Varshavsky, A. (1991) The short-lived MAT $\alpha$ 2 transcriptional regulator is ubiquitinated *in vivo*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 4606-4610
57. Holzer, H. (1976) Catabolite inactivation in yeast. *Trends Biochem. Sci.* 1, 178-181
58. Holzer, H. (1989) Proteolytic catabolite inactivation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell. Biol. Rev.* 21, 305-319
59. Horak, J. & Wolf, D. (1997) Catabolite inactivation of the galactose transporter in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: ubiquitination, endocytosis and degradation in the vacuole. *J. Bacteriol* 179, 1541-9
60. Ito, H., Fukuda, Y., Murata, K. & Kimura, A. (1983) Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations. *J. Bacteriol* 153,
61. Jaworek, D. & Welsch, J. (1985) Adenosine 5'-triphosphate. UV-method with phosphoglycerate kinase. In H. U. Bergmeyer, J. Bergmeyer and M. Graef. *Methods of enzymatic analysis*. 3<sup>rd</sup> ed.
62. Jentsch, S. (1992) Ubiquitin-dependent protein degradation: a cellular perspective. *Trends Cell Biol.* 2, 98-103
63. Johnson, E. S., Ma, P. C. M., Ota, I. M. & Varshavsky, A. (1995) A proteolytic pathway that recognizes ubiquitin as a degradation signal. *J. Biol. Chem.* 270, 17442-17456
64. Johnson, P. R. & Hochstrasser, M. (1997) SUMO-1: ubiquitin gains weight. *Trends Cell Biol.* 7, 408-413
65. Johnston, M., Flick, J. S. & Pexton, T. (1994) Multiple mechanisms provide rapid and stringent glucose repression for *GAL* gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 12, 3834-3841
66. Johnston, S. A., Salmeron, J. M. & Dincher, S. (1987) Interaction of positive regulatory proteins in the galactose regulon of yeast. *Cell* 50, 143-156
67. Jones, E. W. (1991) Three proteolytic systems in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 266, 7963-7966
68. King, R. W., Deshaies, R. J., Peters, J. M. & Kirschner, M. W. (1996) How proteolysis drives the cell cycle?. *Science* 274, 1652-1659

69. Knop, M., Schiffer, H. H., Rupp, S. & Wolf, D. H. (1993) Vacuolar/lysosomal proteolysis: proteases, substrates, mechanisms. *Curr. Op. Cell Biol.* 5, 990-996
70. Kolling, R. & Hollenberg, C. (1994) The ABC-transporter Ste6 accumulates in the plasma membrane in a ubiquitinated form in endocytosis mutants. *EMBO J.* 13, 3261-3271
71. Krampe, S., Stamm, O., Hollenberg, C. P. & Boles, E. (1998) Catabolite inactivation of the high-affinity hexose transporters Hxt6 and Hxt7 of *Saccharomyces cerevisiae* occurs in the vacuole after internalization by endocytosis. *FEBS lett.* 441,
72. Kruckeberg, A. L. (1996) The hexose transporter family of *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch. Microbiol.* 166, 283-292
73. Ktistakis, N. T., Thomas, D. & Roth, M. G. (1990) Characteristics of the tyrosine recognition signal for internalization of transmembrane surface glycoproteins. *J. Cell Biol.* 111, 1393-1407
74. Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685
75. Lagunas, R. (1979) Energetic irrelevance of aerobiosis for *S. cerevisiae* growing on sugars. *Mol. Cell. Biochem.* 27, 139-146
76. Lagunas, R. (1993) Sugar transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol.* 104, 229-242
77. Lagunas, R., DeJuan, C. & Benito, B. (1986) Inhibition of biosynthesis of *Saccharomyces cerevisiae* sugar transport system by tunicamycin. *J. Bacteriol.* Dec., 1484-1486
78. Lagunas, R., Dominguez, C., Busturia, A. & Sáez, M. J. (1982) Mechanisms of appearance of the Pasteur Effect in *Saccharomyces cerevisiae*: inactivation of sugar transport systems. *J. Bacteriol.* 152, 19-25
79. Loureiro-Dias, M. C. & Peinado, J. M. (1984) Transport of maltose in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem. J.* 222, 293-298
80. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. & Randall, R. J. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265-271
81. Lucero, P., Peñalver, E., Moreno, E. & Lagunas, R. (1997) Moderate concentrations of ethanol inhibit endocytosis of the yeast maltose transporter. *Appl. and Environ. Microbiol.* 62, 3831-3836
82. Makarow, M. & Nevalainen, L. T. (1987) Transport of a fluorescent macromolecule via endosomes to the vacuole in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Biol.* 104, 67-75
83. Marchal, C., Haguenuer-Tsapis, R. & Urban-Grimal, D. (1998) A PEST-like sequence mediates phosphorylation and efficient ubiquitination of yeast uracil permease. *Mol. Cell. Biol.* 18, 314-321
84. Martinez, P., Zvyagilskaya, R., Allard, P. & Persson, B. (1998) Physiological regulation of the derepressible phosphate transporter in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* 180, 2253-2256
85. Matsumoto, K., Toh-e, A. & Oshima, Y. (1978) Genetics control of galactokinase synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*: evidence for constitutive expression of the positive regulatory gene *GAL4*. *J. Bacteriol.* 134, 446-457

86. Mayer, R. J. & Doherty, F. (1986) Intracellular protein catabolism: state of the art. *FEBS lett.* 198, 181-193
87. Medintz, I., Jiang, H., Han, E. K., Cui, W. & Michels, C. A. (1996) Characterization of the glucose-induced inactivation of maltose permease in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* 178, 2245-2254
88. Müller, M., Müller, H. & Holzer, H. (1981) Immunochemical studies on catabolite inactivation of phosphoenolpyruvate carboxykinase in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 256, 723-727
89. Neef, J., Hägele, E., Nauhaus, J., Heer, U. & Mecke, D. (1978) Evidence for catabolite degradation in the glucose dependent inactivation of yeast cytoplasmic malate dehydrogenase. *Eur. J. Biochem.* 87, 489-495
90. Nevado, J. & Heredia, C. F. (1996) Galactose induces in *Saccharomyces cerevisiae* sensitivity of the utilization of hexoses to inhibition by D-glucosamine. *Canad. J. Microbiol.* 42, 6-11
91. Nishizawa, k., Shimoda, E. & Kasahara, M. (1995) Substrate recognition domain of the Gal2 transporter in yeast *Saccharomyces cerevisiae* as revealed by chimeric galactose-glucose transporters. *J. Biol. Chem.* 270, 2423-2426
92. Ooi, C. E., Rabinovich, E., Dancis, A., Bonifacino, J. S. & Klausner, R. D. (1996) Copper-dependent degradation of the *Saccharomyces cerevisiae* plasma membrane copper transporter Ctr1p in the apparent absence of endocytosis. *EMBO. J.* 15, 3515-3523
93. Özcan, S., Dover, J., A.G. Rosenwald, Wolf, S. & Johnston, M. (1996) Two glucose transporters in *Saccharomyces cerevisiae* are glucose sensors that generate a signal for induction of gene expression. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93, 12428-12432.
94. Papa, F. R. & Hochstrasser, M. (1993) The yeast *DOA4* gene encodes a deubiquitinating enzyme related to a product of the human *tre-2* oncogene. *Nature* 366, 313-319
95. Peñalver, E., Lucero, P., Moreno, E. & Lagunas, R. (1999) Clathrin and two components of the COPII complex, Sec 23p and Sec24p, could be involved in endocytosis of the *Saccharomyces cerevisiae* maltose transporter. *J. Bacteriol.* 181, 2555-2563
96. Peñalver, E., Ojeda, L., Moreno, E. & Lagunas, R. (1997) Role of the cytoskeleton in endocytosis of the yeast maltose transporter. *Yeast* 13, 541-9
97. Pickart, C. M. (1997) Targeting of substrates to the 26S proteasome. *FASEB* 11, 1055-1066
98. Prescianotto-Baschong, C. & Riezman, H. (1998) Morphology of the yeast endocytic pathway. *Mol. Biol. Cell* 9, 173-179
99. Rechsteiner, M. (1991) Natural substrates of the ubiquitin proteolytic pathway. *Cell* 66, 615-618
100. Rechsteiner, M. & Rogers, S. W. (1996) PEST sequences and regulation by proteolysis. *Trends Biochem. Sci.* 21, 267-271
101. Riballo, E., Herweijer, M., Wolf, D. H. & Lagunas, R. (1995) Catabolite inactivation of the yeast maltose transporter occurs in the vacuole after internalization by endocytosis. *J. Bacteriol.* 177, 5622-5627

102. Riballo, E. & Lagunas, R. (1994) Involvement of endocytosis in catabolite inactivation of the K<sup>+</sup> and glucose transport systems in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol. Lett.* 121, 77-80
103. Riezman, H., Munn, A., Geli, M. I. & Hicke, L. (1996) Actin-, myosin-, and ubiquitin-dependent endocytosis. *Experientia* 52, 1033-1041
104. Rivett, A. J. (1993) Proteasomes: multicatalytic proteinase complexes. *Biochem. J.* 291, 1-10
105. Rodicio, R. (1986) Insertion of non-homologous ADN sequences into a regulatory gene causes a constitutive maltase synthesis in yeast. *Curr. Genet.* 11, 235-241
106. Rohrer, J., Benedetti, H., Zanolari, B. & Riezman, H. (1993) Identification of a novel sequence mediating regulated endocytosis of the G protein-coupled  $\alpha$ -pheromone receptor in yeast. *Mol. Biol. Cell* 4, 511-521
107. Romano, A. H. (1986) Microbial sugar transport systems and their importance in biotechnology. *Trends Biotechnology* August, 207-213
108. Roth, A. F. & Davis, N. G. (1996) Ubiquitination of the yeast  $\alpha$ -factor receptor. *J. Cell Biol.* 134, 661-74
109. Roth, A. F., Sullivan, D. M. & Davis, N. G. (1998) A large PEST-like sequence directs the ubiquitination, endocytosis, and vacuolar degradation of the yeast  $\alpha$ -factor receptor. *J. Cell Biol.* 142, 949-961
110. Sáez, M. J. & Lagunas, R. (1976) Determination of intermediary metabolites in yeast. Critical examination of the effect of sampling conditions and recommendations for obtaining true levels. *Mol. Cell. Biochem.* 13, 73-77
111. Sambrook, H. K., Fritsch, E. F. & Maniatis, T. (1989) Molecular cloning: a laboratory manual. *Cold Spring Harbor, New York.* 2<sup>nd</sup> ed.
112. Schagger, H. & von Jagow, G. (1987) Tricine-sodium dodecyl sulfate polyacrilamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to  $\infty$  kDa. *Anal. Biochem.* 166, 368-379
113. Serrano, R. (1977) Energy requirements for maltose transport in yeast. *Eur. J. Biochem.* 80, 97-102
114. Serrano, R. (1983) *In vivo* glucose activation of the yeast plasma membrane ATPase. *FEBS lett.* 156, 11-14
115. Serrano, R. & DelaFuente, G. (1974) Regulatory properties of the constitutive hexose transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 5, 161-171
116. Sheldon, J. M., Williams, S. P., Fulton, A. M. & Brindle, K. M. (1996) <sup>31</sup>P NMR magnetization transfer study of the control of ATP turnover in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 6399-6404
117. Sherman, F., Fink, G. R. & Hicks, J. B. (1983) Methods in yeast genetics. *Cold Spring Harbor, New York*
118. Silve, S., Volland, C., Garnier, C., Jund, R., Chevallier, M. & Haguenaer-Tsapis, R. (1991) Membrane insertion of uracil permease, a polytopic yeast plasma membrane protein. *Mol. Cell. Biol.* 11, 1114-1124

119. Spence, J., Sadis, S., Hass, A. L. & Finley, D. (1995) A ubiquitin mutant with specific defects in ADN repair and multiubiquitination. *Mol. Cell. Biol.* 15, 1265-1273
120. Springael, J.-Y. & André, B. (1998) Nitrogen-regulated ubiquitination of the Gap1 permease of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Biol. Cell* 9, 1253-1263
121. Springael, J.-Y., Decraene, J. O., Hein, C. & André, B. (1996) Both ubiquitin-ligase Npi1/Rsp5 and ubiquitin hydrolase Npi2/Doa4 are required for ammonium-induced inactivation and degradation of the general amino-acid permease (Gap1) of *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. 14th Small Meeting on Yeast Transport and Energetics* p. 25
122. Springael, J.-Y., Galan, J.-M., Haguenaer-Tsapis, R. & André, B. (1999)  $\text{NH}_4^+$ -induced down-regulation of the *Saccharomyces cerevisiae* Gap1p permease involves its ubiquitination with lysine-63-linked chains. *J. Cell Sci.* 112, 1375-1383
123. Stanbrough, M. & Magasanik, B. (1995) Transcriptional and posttranslational regulation of the general amino acid permease of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* 177, 94-102
124. Stanley, K. K. & Luzio, J. P. (1984) Construction of a new family of high efficiency bacterial expression vectors: identification of cADN clones coding for human liver proteins. *EMBO J.* 3, 1429-1434
125. Strous, G., van Kerkhof, P., Govers, R., Ciechanover, A. & Schwartz, A. L. (1996) The ubiquitin conjugation system is required for ligand-induced endocytosis and degradation of the growth hormone receptor. *EMBO J.* 15,
126. Teichert, U., Mechler, B., Müller, H. & Wolf, D. H. (1989) Lysosomal(vacuolar) proteinases of yeast are essential catalysts for protein degradation, differentiation and cell survival. *J. Biol. Chem.* 264, 16037-16045
127. Terrell, J., Shih, S., Dunn, R. & Hicke, L. (1998) A function for monoubiquitination in the internalization of a G protein-coupled receptor. *Mol. Cell* 1, 193-202
128. Trowbridge, I. S., Collawn, J. F. & Hopkins, C. R. (1993) Signal-dependent membrane protein trafficking in the endocytic pathway. *Annu. rev. Cell Biol.* 9, 129-161
129. Tschopp, J. F., Erm, S. D., Field, C. & Schekman, R. (1986) *Gal2* codes for a membrane-bound subunit of the galactose permease in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* 166, 313-318
130. Umbreit, W. W., Burris, R. H. & Stauffer, J. F. (1957) Manometric techniques. 3<sup>rd</sup> ed. Burgess Publishing Co., Minneapolis, USA.
131. Varshavsky, A. (1991) Naming a targeting signal. *Cell* 64, 13-15
132. Varshavsky, A. (1992) The N-end rule. *Cell* 69, 725-735
133. Varshavsky, A. (1996) The N-end rule: functions, mysteries, uses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 12142-12149
134. Varshavsky, A. (1997) The ubiquitin system. *Trends Biol. Sci.* 22, 383-387
135. Volland, C., Urban-Grimal, D., Géraud, G. & Haguenaer-Tsapis, R. (1994) Endocytosis and degradation of the yeast uracil permease under adverse conditions. *J. Biol. Chem.* 269, 9833-9841

***ANEXO I:*** copia de artículos publicados



Publicaciones relacionadas con esta Tesis (se incluye copia):

- **Lucero, P.**, Herweijer, M. and Lagunas, R. (1993) "Catabolite Inactivation of the Yeast Maltose Transporter Is Due to Proteolysis". *FEBS Lett.* 333,165-168.
- **Lucero, P.** and Lagunas, R. (1997) "Catabolite Inactivation of the Yeast Maltose Transporter Requires Ubiquitin-Ligase *np11/rsp5* and Ubiquitin-Hydrolase *np12/doa4*". *FEMS Microbiol. Lett.* 147, 273-277.
- **Lucero, P.**, Peñalver, E., Vela, L. and Lagunas, R. (2000) "Monoubiquitination Is Sufficient to Signal Internalization of the Maltose Transporter in *Saccharomyces cerevisiae*". *J. Bacteriol.* 182, 241-243.
- Peñalver, E., **Lucero, P.**, Moreno, E. and Lagunas, R. (1998) "Catabolite Inactivation of the Maltose Transporter in Nitrogen-Starved Yeast Could be Due to the Stimulation of General Protein Turnover". *FEMS Microbiol. Lett.* 166, 317-24.

Otras publicaciones (se incluye copia):

- **Lucero, P.**, Peñalver, E., Moreno, E. and Lagunas, R. (1997) "Moderate Concentrations of Ethanol Inhibit Endocytosis of the Yeast Maltose Transporter". *Appl. and Environ. Microbiol.* 63, 3831-3836.
- Peñalver, E., **Lucero, P.**, Moreno, E. and Lagunas, R. (1999) "Clathrin and Two Components of the COPII Complex, Sec23p and Sec24p, Could be Involved in Endocytosis of the *Saccharomyces cerevisiae* Maltose Transporter". *J. Bacteriol.* 181, 2555-63.
- Peñalver, E., **Lucero, P.**, Moreno, E. and Lagunas, R. "Internal Trehalose Protects Endocytosis of the Inhibition by Ethanol in *Saccharomyces cerevisiae*". Enviado para publicación a *Appl. and Environ. Microbiol.*

Publicaciones relacionadas con esta Tesis.

# Catabolite inactivation of the yeast maltose transporter is due to proteolysis

Pilar Lucero<sup>a</sup>, Marga Herweijer<sup>b</sup>, Rosario Lagunas<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup>*Instituto de Investigaciones Biomédicas de CSIC, Arturo Duperier 4, 28029 Madrid, Spain*

<sup>b</sup>*Gist-Brocades, PO Box 1, 2600 MA Delft, The Netherlands*

Received 9 August 1993; revised version received 9 September 1993

The maltose transport capacity of fermenting *Saccharomyces cerevisiae* rapidly decreases when protein synthesis is impaired. Using polyclonal antibodies against a recombinant maltose transporter-protein we measured the cellular content of the transporter along this inactivation process. Loss of transport capacity was paralleled by a decrease of cross-reacting material which suggests degradation of the transporter. We also show that in ammonium-starved cells the half-life of the maltose transporter is 1.3 h during catabolism of glucose and > 15 h during catabolism of ethanol.

Catabolite inactivation; Maltose transport; Transport inactivation; Transport turnover; *Saccharomyces cerevisiae*

## 1. INTRODUCTION

Most proteins in *Saccharomyces cerevisiae* are stable for long periods of time under different metabolic conditions [1–4]. Sugar transporters behave differently in this respect, in that a rapid and irreversible inactivation is observed upon arrest of protein synthesis [4–7]. This inactivation, that mainly affects the  $V_{\max}$ , follows first-order kinetics and is an energy-dependent process stimulated by fermentable substrates [8–10]. The characteristics of the inactivation as well as preliminary results obtained with antibodies against an epitope attached to the maltose transporter [11] suggest that this inactivation might be due to proteolysis. This research attempts to check this possibility. For this purpose we have prepared polyclonal antibodies against a recombinant maltose transporter-protein and have measured the cellular content of this transporter along the inactivation process.

Two distinct maltose transporters have been identified in *Saccharomyces* that are expressed in maltose fermenting strains: one encoded by the Gene 1 of the *MAL* loci (*MAL11* through *MAL41* and *MAL61*) [12,13] and another one encoded by the *AGT1* gene [11]. These two transporters show great sequence similarity and are induced by maltose and repressed by glucose [11]. Both are proton symporters and are similarly inactivated upon protein synthesis impairment [11]. Actually, their only known difference concerns its specificity: while the *MAL* transporter only transports maltose and turanose, the *AGT1* transporter transports isomaltose,  $\alpha$ -methylglucoside, and maltotriose as well as maltose

and turanose [11]. In this work two different strains have been used: a strain that only express the *MAL1* locus and that, therefore, allowed us to investigate the behaviour of a unique *MAL* transporter, and another strain that might express more than one *MAL* locus. The results obtained with both strains strongly indicate that the maltose transport inactivation is due to proteolysis.

## 2. EXPERIMENTAL

The following strains of *S. cerevisiae* were used: *MAL1-1<sup>c</sup>-D* (*MAT a leu1 trp1 MAL13-1<sup>c</sup> [mal22 mal23]::TRP1*) [14], ATCC 42407 (*MAT a suc<sup>-</sup> MAL GAL*), and *MAL1-1<sup>c</sup>-D-pRM1-1* (strain *MAL1-1<sup>c</sup>-D* transformed with plasmid pRM1-1). Plasmid pRM1-1 is a multi-copy plasmid that carries the *MAL1* locus [14]. Cells were grown at 30°C in liquid medium containing 1% yeast extract/2% peptone/3 ppm antimycin A and 2% maltose or glucose as indicated. Cell growth was monitored by optical absorbance measurement at 640 nm. Inactivation of the maltose transport was achieved by suspending exponentially growing cells in an ammonium-free medium as described in [9] in the presence of 2% glucose or ethanol as indicated in each case.

Maltose transport was measured as in [15] and fermentation as in [16]. A fusion-gene was constructed containing 658 bp *EcoRI-HincII* fragment of the maltose transporter gene and the *lacZ'* gene as present in plasmid pEX-3 [17]. The resulting plasmid, pEXMPO3, was used to transform *E. coli* strain POP2136 (Boehringer-Mannheim Biochimica catalogue, 90/91). Isolation of inclusion bodies was performed essentially as described in [18]. To purify the fusion-protein, the inclusion bodies were successively treated with 1 ml of 5 M and 8 M urea in 0.1 M Tris-HCl, pH 8.5. Both batches were combined and dialyzed in the cold against 1 litre of 1.4 M NaCl/27 mM KCl/15 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ /81 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , pH 7.4 (PBS). The precipitated fusion-protein was recovered by centrifugation and suspended in 2 ml of PBS. A total of 10.6 mg protein was obtained with a estimated purity of about 80%. Antibodies were raised in rabbits by 3 injections of approx. 250  $\mu\text{g}$  of the fusion-protein.

Extracts and crude and purified plasma membrane preparations were obtained as in [19]. When indicated the extracts were obtained in the presence of the following proteinases inhibitors: 5 mM EDTA,

\*Corresponding author. Fax: (34) (1) 585-4587.

Table I  
Transport and fermentation rate by the used strains

Strain	Transport (mmol · g protein <sup>-1</sup> · h <sup>-1</sup> )		Fermentation (mmol · g protein <sup>-1</sup> · h <sup>-1</sup> )	
	Maltose	Maltose	Isomaltose	α-Methylglucoside
ATCC 42407	2.6	10.1	< 0.5	< 0.5
MAL1-1 <sup>c</sup> -D-pRM1-1	2.7	15.0	< 0.5	< 0.5

Cells were grown with 2% maltose, harvested during logarithmic growth, washed with water and suspended in fresh medium containing 2% of the indicated sugars in the presence of 3 ppm antimycin A. Transport and fermentation were measured as indicated in section 2.

1 mM PMSF, 1 mM benzamidine, 1 mM *o*-phenanthroline, 1 mM iodoacetate, 10 μg leupeptin, 20 μg chymostatin, and 3 μg aprotinin. Proteins were separated by electrophoresis in 10% SDS-polyacrylamide and transferred to nitrocellulose BA-85 by semidry blotting using 25 mM Tris, 0.19 M glycine and 20% methanol as buffer [20]. Immunodetection was achieved using a 1/1000 dilution of the immune sera and alkaline phosphatase [21]. The cellular content of the maltose transporter was measured by immunoblotting increasing amounts (5–20 μg protein) of crude extracts obtained at different intervals after the start of the inactivation. In all cases representation of the intensity of the transporter bands plotted versus the total protein was a straight line (see below) whose slope was taken as proportional to the amount of transporter. Intensity of the bands was quantified by scanning densitometry with a SilverScan connected to a Macintosh IICi using the NIH image 1.42 software. Peak area was quantified in pixels after equalizing the acquired image.

Protein was determined after precipitation with trichloroacetic acid using the method of Lowry et al. [22].

### 3. RESULTS AND DISCUSSION

#### 3.1. Suitability of the used strain to estimate the cellular content of a unique maltose transporter

The polyclonal antibodies raised against the maltose transporter fusion-protein (see section 2) will cross-react with the five maltose transporters (product of the Gene 1 of the five *MAL* loci) and, probably, with the

isomaltose (AGT1) transporter with which the former show a great sequence similarity [11]. Therefore, to measure the cellular content of a unique maltose (MAL) transporter, a strain that only expresses one *MAL* locus and that does not express AGT1 is required. To meet this requirement we used a mutant (MAL1-1<sup>c</sup>-D) defective in all maltose transporters [14]. As expected, this mutant was unable to grow on maltose as well as to transport and to ferment this sugar (results not shown). This mutant was transformed with a multicopy plasmid that carries the *MAL1* locus [14]. The resulting strain (MAL1-1<sup>c</sup>-D-pRM1-1) grew, transported, and fermented maltose at a similar rate as a wild type strain (ATCC 42407) (Table I). Both the transformed strain, that only expresses one MAL transporter, as well as the wild type strain, that might express more than one MAL transporter, were unable to ferment two specific substrates of the isomaltose transporter, isomaltose and α-methylglucoside (Table I) [11]. These results indicate that the AGT1 gene is not expressed in these strains.

#### 3.2. Suitability of the antibodies to estimate the cellular content of the maltose transporter

When extracts of maltose grown cells were subjected to SDS-gel electrophoresis and probed with the immune sera raised against the MAL transporter-lacZ' fusion protein three bands of about 67, 62, and 57 kDa were detected whose intensity increased as the sample was enriched in the plasma membrane fraction (Fig. 1). These bands were not detected with the preimmune sera and appeared only in extracts of maltose grown cells (Fig. 2). These results show that the antibodies recognize a set of plasma membrane proteins, inducible by maltose, with a molecular size close to the 68.2 kDa predicted by the sequence of the maltose transporter gene [13,23]. Therefore we concluded that these bands correspond to the maltose transporter. The observed molecular size heterogeneity probably reflects post-translational modifications, i.e. glycosylation [24]. However, the possibility that the two bands of lower molecular size are proteolytic products of the transporter cannot be excluded even though these bands appeared also in samples obtained in the presence of a cocktail of proteinase inhibitors. Additional bands that appeared

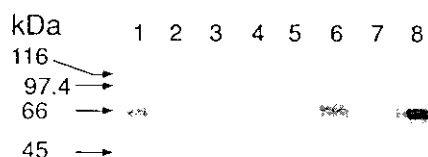


Fig. 1. Immunodetection of the maltose transporter in crude extracts and membrane preparations. Strains ATCC 42407 (lanes 1,2) and MAL1-1<sup>c</sup>-D-pRM1-1 (lanes 3–8) were grown on glucose (lanes 2,3,5,7) or maltose (lanes 1,4,6,8). Aliquots containing 12 mg protein of crude extracts (lanes 1–4), crude membrane preparations (lanes 5,6), or plasma membrane preparations (lanes 7,8) were analyzed using the immune sera.

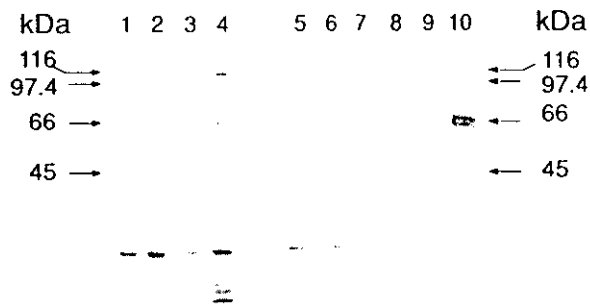


Fig. 2. Detection of the maltose transporter with the preimmune and the immune sera. Strains ATCC 42407 (lanes 1-4) and MAL1-1<sup>c</sup>-D-pRM1-1 (lanes 5-10) were grown on glucose (lanes 1,3,5,7,9), or maltose (lane 2,4,6,8,10). Aliquots of crude extracts containing 15  $\mu$ g protein were analyzed using the secondary antibody (lanes 5,6), the secondary antibody plus the preimmune sera (lanes 1,2,7,8), or the secondary antibody plus immune sera (lanes 3,4,9,10).

in the immunoblots were not related with the transporter since they were present in samples of non-induced cells and were recognized by the preimmune sera as well as by the secondary antibody (Fig. 2). Increasing amounts of crude extracts from maltose grown cells resulted in a proportional increase in the intensity of the three bands of the transporter in the immunoblot (Fig. 3). This result (see section 2) as well as those reported above show that the antibodies are suitable for the estimation of the cellular content of the maltose transporter.

### 3.3. Inactivation is accompanied by a decrease in the cellular content of the transporter

Maltose transporter is irreversibly inactivated in fermenting yeast when its synthesis is impaired [4,8]. We have measured the cellular content of this transporter during the inactivation process using the strain that only express the *MAL1* locus. To this end increasing amounts of crude extracts of non-inactivated cells (lanes 1-4, Fig. 3A) and of 4 h-inactivated cells (lanes 5-8, Fig. 3A) were analyzed. The results showed that the content of the transporter, measured by the slope of the straight line obtained plotting the intensity of the bands versus the protein content (see section 2), decreased by > 90% during 4 h under the inactivating conditions (Fig. 3B). However, during this period no substantial differences were observed in the case of a protein unrelated with the maltose transporter (Fig. 3B, internal control). A detailed study showed that the decrease of the transporter content followed first-order kinetics and run in parallel to the transport inactivation (Fig. 4). From data shown in Fig. 4 it could be calculated that the half-life of this transporter in ammonium starved cells is about 1.3 h during catabolism of glucose and > 15 h during catabolism of ethanol. Similar results were found using the strain that might express more than one *MAL* locus (results not shown).

The results presented in this work strongly indicate that the catabolite inactivation of the maltose transporter is due to proteolysis. It is well known that proteolysis is also involved in catabolite inactivation of a number of cytoplasmic proteins [25], i.e. malate dehydrogenase [26], aminopeptidase I [27], fructose-1,6-bisphosphatase [28], and phosphoenolpyruvate carboxykinase [29]. These facts suggest that proteolysis is a general mechanism of catabolite inactivation of both cytoplasmic and plasma membrane proteins. Degradation of most plasma membrane proteins occurs by endocytosis [30]. However, some of these proteins might be also degraded in the ubiquitine pathway. This is indicated by the fact that, in mammalian cells, a number of plasma membrane proteins are specifically conjugated with

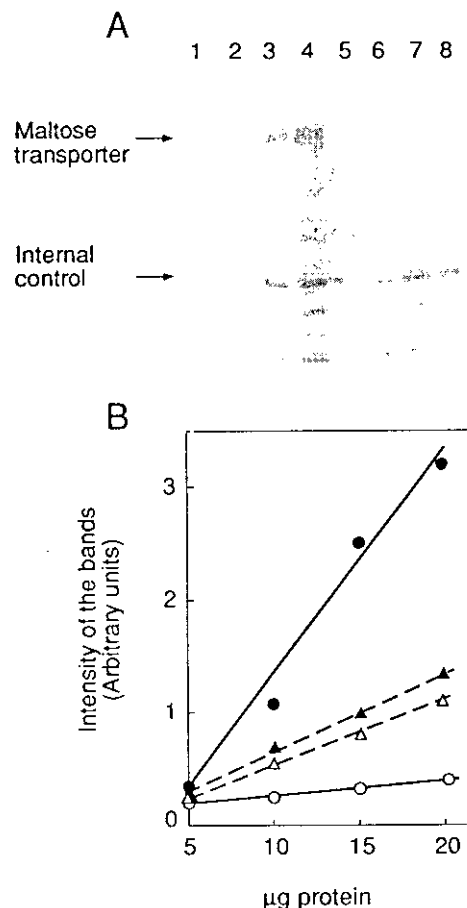


Fig. 3. Decrease in the cellular content of the maltose transporter during the inactivation process. (A) MAL1-1<sup>c</sup>-pRM1-1 cells exponentially growing on maltose were harvested, washed and suspended in 3-times the initial volume of the ammonium-free medium in the presence of 2% glucose and 3 ppm antimycin A. Crude extracts were obtained immediately (lanes 1-4) or after 4 h incubation at 30°C (lanes 5-8). Samples containing 5  $\mu$ g protein (lane 1,5), 10  $\mu$ g (lanes 2,6), 15  $\mu$ g (lanes 3,7), and 20  $\mu$ g (lanes 4,8) were analyzed using the immune sera. (B) Intensity of the (●), (○) maltose transporter bands and of the internal control protein band (▲, △) were measured. Dark symbols correspond to the extract obtained immediately and open symbols to the extract obtained after 4 h of incubation in the inactivating conditions.

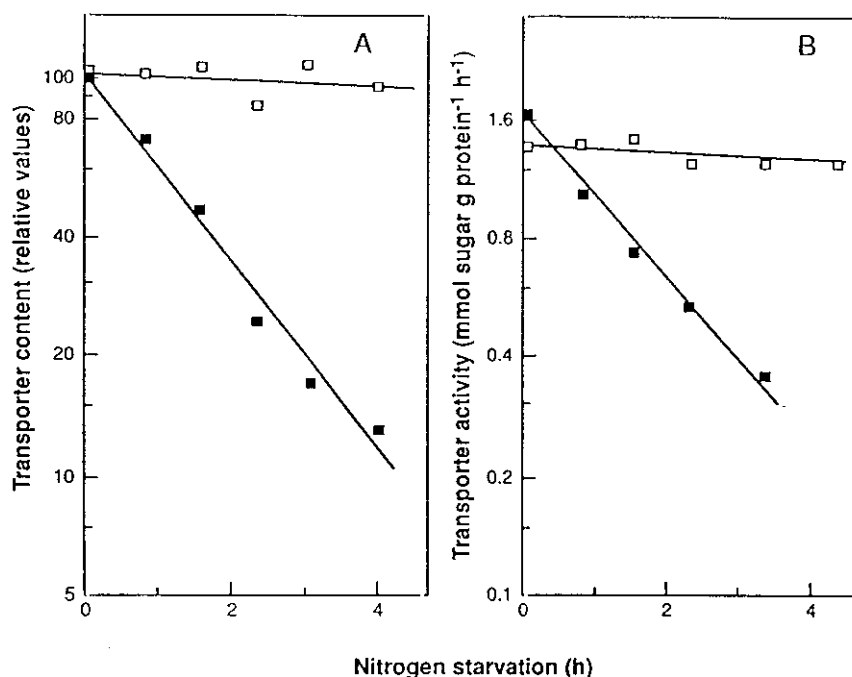


Fig. 4. Effect of the inactivating conditions on the content and activity of the maltose transporter. MAL1-1<sup>c</sup>-pRM1-1 cells were harvested during exponential growth on maltose, washed and suspended in 3-times the initial volume of the media specified below. After incubation at 30°C for the indicated times, cells were harvested, washed and assayed for (A) maltose transporter content and (B) maltose transport activity using crude extracts. Transfer media: ammonium-free medium containing 2% glucose (■) or 2% ethanol (□).

ubiquitine [31]. It would be interesting to establish which one of these two pathways is involved in catalytic inactivation of the maltose transporter.

*Acknowledgements:* We are very grateful to B. Deiman and P. Schopink (Gist-brocades) for their valuable contribution to the preparation of the antibodies, to Dr. R. Rodicio for the mutant strains and for the plasmid, and to Drs. C. Gancedo and J.M. Gancedo for critical reading of the manuscript. This work was supported by Dirección General Científica y Técnica (PB 91-0056)

## REFERENCES

- [1] Halvorson, H. (1958) *Biochim. Biophys. Acta* 27, 255-266.
- [2] Halvorson, H. (1958) *Biochim. Biophys. Acta* 27, 267-276.
- [3] López, S. and Gancedo, J.M. (1979) *Biochem. J.* 178, 769-766.
- [4] Lagunas, R., Dominguez, C., Busturia, A. and Sáez, M.J. (1982) *J. Bacteriol.* 152, 19-25.
- [5] Alonso, A. and Kotyk, A. (1978) *Folia Microbiol.* 23, 118-123.
- [6] Holzer, H. (1976) *Trends Biochem. Sci.* 1, 178-181.
- [7] Matern, H. and Holzer, H. (1977) *J. Biol. Chem.* 252, 6399-6402.
- [8] Busturia, A. and Lagunas, R. (1985) *Biochim. Biophys. Acta* 820, 324-326.
- [9] Busturia, A. and Lagunas, R. (1986) *J. Gen. Microbiol.* 132, 379-385.
- [10] DeJuan, C. and Lagunas, R. (1986) *FEBS Lett.* 207, 258-265.
- [11] Han, F.K. and Michels, C.A. (1992) *Yeast* 8, Spec. Iss. S512.
- [12] Cheng, Q. and Michels, C.A. (1991) *J. Bacteriol.* 173, 1817-1820.
- [13] Cheng, Q. and Michels, C.A. (1988) *Genetics* 123, 477-484.
- [14] Rodicio, R. (1986) *Curr. Genet.* 11, 235-241.
- [15] Benito, B. and Lagunas, R. (1991) *J. Bacteriol.* 174, 3065-3069.
- [16] Lagunas, R. and Gancedo, C. (1983) *Eur. J. Biochem.* 137, 479-483.
- [17] Stanley, K.K. and Lazio, J.P. (1984) *EMBO J.* 3, 1429-1434.
- [18] Glover, D.M. (1987) in: *DNA Cloning*, vol. III, Practical Approach Series, pp. 59-88, IRC Press, Oxford/Washington DC.
- [19] Serrano, R. (1988) *Methods Enzymol.* 157, 533-544.
- [20] Towbin, H., Staehelin, T. and Gordon, J. (1979) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76, 4350-4354.
- [21] Blake, M.S., Johnston, K.H., Russel-Jones, G.F. and Gotschlich, E.C. (1984) *Anal. Biochem.* 136, 175.
- [22] Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J. (1951) *J. Biol. Chem.* 193, 265-271.
- [23] Yao, B., Sollitti, P. and Marmur, J. (1989) *Gene* 79, 189-197.
- [24] Lagunas, R., DeJuan, C. and Benito, B. (1986) *J. Bacteriol.* 168, 1484-1486.
- [25] Holzer, H. (1989) *Cell Biol. Rev.* 21, 305-319.
- [26] Neef, J., Hagele, E., Nauhaus, J., Heer, U. and Mecke, D. (1978) *Eur. J. Biochem.* 87, 489-495.
- [27] Frey, J. and Rohm, K. H. (1979) *FEBS Lett.* 100, 261-264.
- [28] Funayama, S., Gancedo, J.M. and Gancedo, C. (1980) *Eur. J. Biochem.* 109, 61-66.
- [29] Muller, M., Muller, H. and Holzer, H. (1981) *J. Biol. Chem.* 256, 723-727.
- [30] Hare, J.F. and Taylor, K. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 5902-5906.
- [31] Siegelman, M., Bond, W., Gallatin W.M., St. John, T., Smith, H.T., Fried, V.A. and Weissman, I.L. (1986) *Science* 231, 823-829.

# Catabolite inactivation of the yeast maltose transporter requires ubiquitin-ligase *npi1/rsp5* and ubiquitin-hydrolase *npi2/doa4*

Pilar Lucero, Rosario Lagunas \*

*Instituto de Investigaciones Biomédicas, CSIC, Arturo Duperier 4, 28029 Madrid, Spain*

Received 8 November 1996; revised 18 December 1996; accepted 23 December 1996

## Abstract

The maltose transporter in *Saccharomyces cerevisiae* is degraded in the vacuole after internalization by endocytosis when protein synthesis is impaired and a fermentable substrate is present. The possible implication of the ubiquitin pathway in this inactivation, known as catabolite inactivation, has been investigated. Using mutants deficient in *npi1/rsp5* ubiquitin-protein ligase and *npi2/doa4* ubiquitin-protein hydrolase, we have shown that these two enzymes are required for normal endocytosis and degradation of the transporter. These facts indicate that the ubiquitin pathway is involved in catabolite inactivation of the maltose transporter. The results also revealed that both enzymes act in the internalization step of endocytosis.

*Keywords:* Catabolite inactivation; Endocytosis; Maltose transporter; Proteolysis; Ubiquitin pathway; *Saccharomyces cerevisiae*

## 1. Introduction

The maltose transporter is inactivated in yeast when protein synthesis is impaired and a fermentable carbon source is present [1]. This inactivation, known as catabolite inactivation, is due to a proteolysis of the transporter [2] which does not require the proteasome function and which occurs in the vacuole after internalization by endocytosis [3]. The experiments reported here attempt to establish if the ubiquitin pathway is implicated in the vacuolar degradation of this plasma membrane protein. For many years the most thoroughly characterized function of protein ubiquitination has been as a signal for deg-

radation of cytosolic proteins in the proteasome (for review see [4]). However, recent findings strongly indicate that ubiquitination may also act as a signal for internalization by endocytosis and subsequent degradation of plasma membrane proteins in the vacuole [5–9].

The ubiquitin pathway consists of two distinct steps, marking of the protein by attachment of ubiquitin and degradation of the tagged protein with recycling of free ubiquitin. In the first step different groups of enzymes are involved: ubiquitin-activating enzymes (E1), which activate ubiquitin by forming a thiol-ester intermediate with the C-terminus of ubiquitin, and ubiquitin-conjugating enzymes (E2), which transfer activated ubiquitin from E1 to the target protein bound to a ubiquitin-protein ligase (E3). In the second step free ubiquitin is released in the ter-

\* Corresponding author. Tel.: +34 (1) 585 4614; fax: +34 (1) 585 4587.

minimal stages of protein degradation by the action of ubiquitin-protein hydrolases (E4) [4]. To establish if the ubiquitin pathway is involved in endocytosis and degradation of the maltose transporter we used E3 [6] and E4 [10] deficient mutant strains. In these strains we investigated the internalization step of endocytosis by measuring maltose transport with radioactive sugar and degradation of the transporter with polyclonal antibodies. The results obtained strongly indicate that the ubiquitin pathway is involved in catabolite inactivation of the yeast maltose transporter.

## 2. Materials and methods

D-(U-<sup>14</sup>C)Maltose and ECL chemiluminescence reagents were from Amersham International (Amersham, UK). Goat antibodies anti-rabbit peroxidase conjugate was from Biosource International (Camarillo, CA).

The following strains were used: 23346c (*MATa NPII ura3*), 27038a (*MATa npil ura3*) [6], MHY501 (*MATa DOA4 his3-Δ200 leu2-3,112 ura3-52 lys2-801 trp1-1*), MHY623 (*MATa doa4::LEU2 his3-Δ200 leu2-3 ura3-52 lys2-901 trp1-1*) [10]. These strains were transformed with the multicopy plasmid pRM1-1, which carries the *MAL1* locus [11]. The transformed cells, which grew and transported maltose at normal rates, were grown at 30°C in a rotatory shaker (200 rpm) in a YNB minimal medium with 2% maltose and in the presence of 3 ppm antimycin A. Cell growth was monitored by measuring optical densities at 640 nm. To start inactivation, cells were harvested during exponential growth (about 0.7 mg dry weight per ml), washed and suspended in three volumes of an ammonium-free medium as described previously [3] in the presence of 2% glucose and 250 μg of tetracycline chloride per ml to avoid bacterial contamination. The suspension was incubated at 30°C in a rotatory shaker (200 rpm). Internalization by endocytosis of the maltose transporter was followed by measuring the decrease in the rate of maltose transport. Maltose transport was determined using radioactive maltose as described previously [3]. Degradation of the transporter was followed with polyclonal antibodies using crude cellular extracts [2]. Samples containing

20 μg protein were resolved by 10% SDS-PAGE and the maltose transporter was visualized using ECL chemiluminescence detection. Antiserum against maltose transporter diluted 1/3000 in blocking buffer and goat anti-rabbit peroxidase conjugate diluted 1/10000 were used as primary and secondary antibodies respectively. Protein was determined after precipitation with trichloroacetic acid using the method of Lowry et al. [12].

## 3. Results

### 3.1. Inactivation of the maltose transporter in an ubiquitin-protein ligase deficient mutant

Two ubiquitin-protein ligases (E3 enzymes) have so far been identified in yeast cells. One is Ubr1p, which acts through the N-end rule pathway [13]. The other is Npi1p/Rsp5p which is similar to human E6-AP [6]. To investigate if signaling with ubiquitin is involved in endocytosis and degradation of the maltose transporter we used a mutant strain deficient in the Npi1/Rsp5 ubiquitin-protein ligase. This enzyme has been shown to be implicated in endocytosis and degradation in the vacuole of two plasma membrane proteins, the general amino acid permease [6] and uracil permease [8]. A single and essential gene, *gene NPII/RSP5*, codes for Npi1p/Rsp5p *S. cerevisiae* and we used a viable *npilrsp5* strain which shows reduced expression of *NPII/RSP5* [6]. We found that internalization of the transporter, monitored by measuring the decrease in transport activity, was substantially reduced in the mutant compared with the isogenic wild-type strain (Fig. 1A). While in wild-type cells the calculated half-life was about 0.5 h, the value was about 1.8 h in *npilrsp5* mutant cells. A similar difference between the mutant and the wild-type strain became apparent when degradation was followed with antibodies (Fig. 1B). Also in this case degradation was substantially reduced in the mutant compared with the wild-type strain.

### 3.2. Inactivation of the maltose transporter in an ubiquitin-protein hydrolase deficient mutant

Operation of the ubiquitin pathway requires recycling of ubiquitin. This function is carried out by



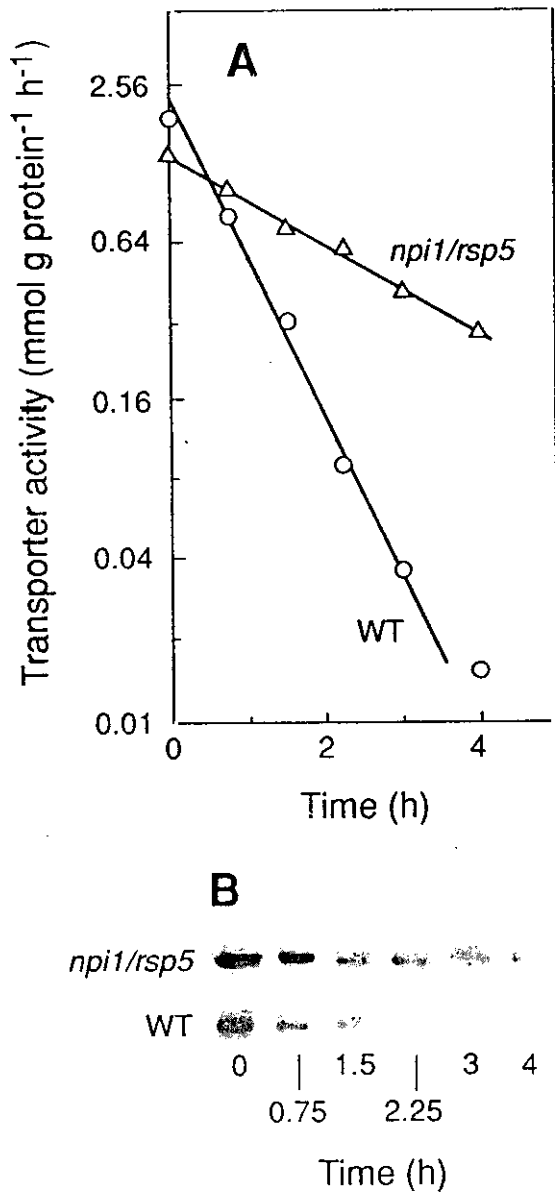


Fig. 1. Inactivation of the maltose transporter in an ubiquitin-protein ligase deficient mutant. Strains 2334c (*NPI1/RSP5* (WT)) (○) and 27038a (*npi1/rsp5*) (△), transformed with the plasmid pRMI-1 carrying the *MAL1* locus, were harvested during exponential growth at 30°C, washed and suspended in three volumes of the inactivating medium. After incubation at 30°C for the indicated times, the cells were harvested and assayed for maltose transport activity (A). Data are mean values of two experiments. The results of the two experiments differed by less than 10%. The maltose transporter band was detected by immunoblotting aliquots of cellular extracts obtained at the indicated times (B).

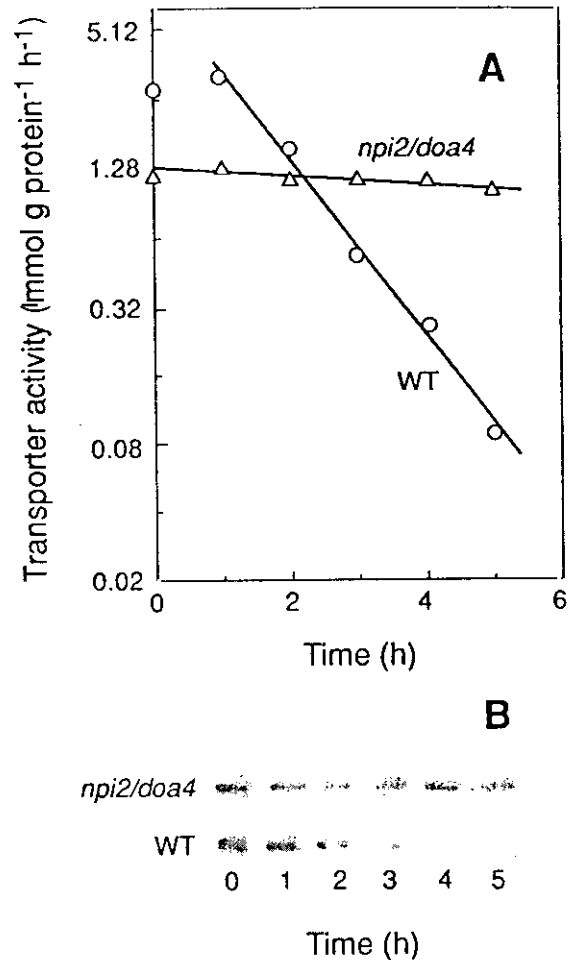


Fig. 2. Inactivation of the maltose transporter in an ubiquitin-protein hydrolase deficient mutant. Strains MHY501 (*NPI2/DOA4* (WT)) (○) and MHY623 (*npi2/doa4*) (△), transformed with plasmid pRMI-1 carrying the *MAL1* locus, were treated as in Fig. 1. At the indicated times cells were harvested and assayed for maltose transport activity (A). Data are mean values of two experiments. The results of the two experiments differed by less than 10%. The maltose transporter band was detected by immunoblotting of cellular extracts obtained at the indicated times (B).

ubiquitin C-terminal hydrolases (E4 enzymes) which may also be implicated in other functions like processing of ubiquitin precursors and disassembling of the polyubiquitin chains linked to the protein substrate during the degradative process [4]. Five E4 hydrolases, at least, have been identified in *S. cerevisiae*. Npi2p/Doa4p is a member of this family of

deubiquitinating enzymes, and elimination of this enzyme from the cells results in a strong inhibition of proteolysis of all tested ubiquitin-dependent substrates [10]. Using a disruption mutant of the *NPI2/DOA4* gene [10] we found that internalization (Fig. 2A) as well as degradation of the maltose transporter (Fig. 2B) in the *npi2/doa4* mutant strain were substantially reduced compared with the wild-type isogenic strain. From data of Fig. 2A a half-life value of about 6 h could be calculated in mutant cells, whereas the calculated value was about 0.8 h in wild-type cells.

#### 4. Discussion

The results show that two enzymes, at least, of the ubiquitin pathway, Npi1/Rsp5 ubiquitin-protein ligase and Npi2/Doa4 ubiquitin-protein hydrolase, are required for normal catabolite inactivation of the yeast maltose transporter. These facts suggest that ubiquitin is implicated in proteolysis of this transporter. The results also show that these two enzymes act in an early stage of this proteolysis, i.e. in the internalization of the transporter. This conclusion comes from the observation that the maltose transporter remains active in the plasma membrane, being internalized at a low rate, when activity of any of these two enzymes decreased. The observed differences in the effect of these two enzymes could be related with differences in their cellular expression. A reduced expression of the ubiquitin-ligase takes place in the *npi1* mutant cells [6] whereas no expression at all takes place in the case of the ubiquitin-hydrolase [10]. The results are in agreement with the postulated role of ubiquitin-protein ligases facilitating transfer of activated ubiquitin to protein substrates [4,6,8]. In addition, the results suggest a role of the Npi2/Doa4 ubiquitin-hydrolase in vacuolar proteolysis not previously reported. Ubiquitin-hydrolases, in general, are involved in recycling of free ubiquitin. In addition, distinct ubiquitin-hydrolases seem to serve different functions at different stages of proteolysis: (i) cleaving of ubiquitin in early stages, during processing of polyubiquitin-chain precursors; (ii) cleaving of ubiquitin from protein conjugates in the middle stages of proteolysis, to reverse the modification of inappropriately targeted pro-

teins; (iii) cleaving of ubiquitin in the late stages, during proteolysis of protein conjugates by the 26S proteasome [10]. In the case of Npi2/Doa4 hydrolase, the contribution to recycling of free ubiquitin seems rather low [10] whereas this enzyme seems to play an important role in late stages of proteolysis by the proteasome, in disassembling multiubiquitin chains on protein fragments still bound to the 26S proteasome [10]. Our results indicate that, in addition, Npi2p/Doa4p also plays an important role in vacuolar proteolysis of the maltose transporter although, in this case, its function occurs at an early stage, in internalization of the protein. A possible function of Npi2/Doa4 in degradation of this protein in the vacuole is cleaving of ubiquitin during processing of the polyubiquitin chain precursors. This processing occurs in early stages of proteolysis, before signaling the target proteins with ubiquitin. Therefore, a deficient processing of the precursors could affect signaling for internalization not only of the maltose transporter but also of other plasma membrane proteins. This possibility is supported by the observation that Npi2p/Doa4p is also required for internalization of the general amino acid permease [14], another plasma membrane protein which is degraded in the vacuole [6].

The results presented in this work support the emerging view [5-9] that ubiquitin binding can function not only as a signal for proteolysis by the proteasome, as accepted for many years, but also as a signal that triggers endocytosis of plasma membrane proteins for degradation in the vacuole.

#### Acknowledgments

We are very grateful to A. André for the gift of the *npi1/rsp5* strain, to M. Hochstrasser for the gift of the *npi2/doa4* strain, to R. Rodicio for the gift of plasmid pRM1-1 and to M. Herweijer for the gift of the polyclonal antibodies. We are also very grateful to J. Pérez and A. Fernandez for help in the preparation of the figures, and to C. Gancedo for critically reading the manuscript. This work was supported by the Spanish Dirección General Científica y Técnica (PB 94-0091-CO201) and by the European Commission (BIO4-CT95-0107).

## References

- [1] Busturia, A. and Lagunas, R. (1985) Identification of two forms of the maltose transport system in *Saccharomyces cerevisiae* and their regulation by catabolite inactivation. *Biochim. Biophys. Acta* 820, 324–326.
- [2] Lucero, P., Herweijer, M. and Lagunas R. (1993) Catabolite inactivation of the yeast maltose transporter is due to proteolysis. *FEBS Lett.* 333, 165–169.
- [3] Riballo, E., Herweijer, M., Wolf, D.H. and Lagunas, R. (1995) Catabolite inactivation of the yeast maltose transporter occurs in the vacuole after internalization by endocytosis. *J. Bacteriol.* 177, 5622–5627.
- [4] Hochstrasser, M. (1995) Ubiquitin, proteasomes, and regulation of intracellular protein degradation. *Curr. Opin. Cell Biol.* 7, 215–223.
- [5] Kolling, R. and Hollenberg, C. (1994) The ABC-transporter Ste6 accumulates in the plasma membrane in a ubiquitinated form in endocytosis mutants. *EMBO J.* 13, 3261–3271.
- [6] Hein, C., Springael, J.-Y., Volland, C., Haguenaer-Tsapis, R. and André, B. (1995) *NPI1*, an essential yeast gene involved in induced degradation of *Gap1* and *Fur4* permeases, encodes the Rsp5 ubiquitin-protein ligase. *Mol. Microbiol.* 18, 77–87.
- [7] Egner, E. and Kuchler, K. (1996) The yeast multidrug transporter *Pdr5* of the plasma membrane is ubiquitinated prior to endocytosis and degradation in the vacuole. *FEBS Lett.* 378, 177–181.
- [8] Galan, J.M., Moreau, V., André, B., Volland C. and Haguenaer-Tsapis, R. (1996) Ubiquitination mediated by the *Npi1p/Rsp5p* ubiquitin-protein ligase is required for endocytosis of the yeast uracil permease. *J. Biol. Chem.* 271, 10946–10952.
- [9] Hicke, L. and Riezman, H. (1996) Ubiquitination of a yeast plasma membrane receptor signals its ligand-stimulated endocytosis. *Cell* 84, 277–287.
- [10] Papa, F.R. and Hochstrasser, M. (1993) The yeast *DOA4* gene encodes a deubiquitinating enzyme related to a product of the human *tre-2* oncogene. *Nature* 366, 313–319.
- [11] Rodicio, R. (1986) Insertion of non-homologous DNA sequences into a regulatory gene cause a constitutive maltase synthesis in yeast. *Curr. Genet.* 11, 235–241.
- [12] Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 267–275.
- [13] Bartel, B., Wunning, I and Varshavsky, A (1990) The recognition component of the N-end rule pathway. *EMBO J.* 9, 3179–3189.
- [14] Springael, J.-Y., Decracne, J.O., Hein, C. and André, B. (1996) Both ubiquitin-ligase *Npi1/Rsp5* and ubiquitin hydrolase *Npi2/Doa4* are required for ammonium-induced inactivation and degradation of the general amino-acid permease (*Gap1*) of *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. 14th Small Meeting on Yeast Transport and Energetics*, p. 25.



## Monoubiquitination Is Sufficient To Signal Internalization of the Maltose Transporter in *Saccharomyces cerevisiae*

PILAR LUCERO, ÉLIDA PEÑALVER, LAURA VELA, AND ROSARIO LAGUNAS\*

*Instituto de Investigaciones Biomédicas "Alberto Sols," Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Arturo Duperier 4, 28029 Madrid, Spain*

Received 21 July 1999/Accepted 8 October 1999

**Monoubiquitination of the 12-transmembrane segment (12-TMS) yeast maltose transporter promoted the maximal internalization rate of this protein. This modification is similar to that of the 7-TMS  $\alpha$ -factor receptor but different from that of the 12-TMS uracil and general amino acid permeases. This result shows that binding of ubiquitin-Lys63 chains is not required for maximal internalization of all 12-TMS-containing proteins.**

Binding of ubiquitin (Ub) acts as a signal for at least two different processes in *Saccharomyces cerevisiae*: for the degradation of cytosolic proteins by the proteasome (3) and for the internalization, for subsequent degradation, of plasma membrane proteins in the vacuole (8). Ub binds through its C terminus to a lysine residue found within target proteins by the action of a cascade of enzymes: Ub-activating enzymes (E1), Ub-conjugating enzymes (E2), and Ub-protein ligase enzymes (E3) (10). Since Ub itself contains seven lysine residues within its sequence, multi-Ub chains bound to proteins can be formed by linking the C terminus of one Ub to a lysine within another Ub. It has been proposed that the differences between the Ub chains bound to cytosolic and plasma membrane proteins could serve for recognition by their respective degradation systems (7, 22, 23).

In yeast cells, Ub chains linked through Lys29, -48, and -63 are present in vivo (1, 6, 11, 21), and it is well established that Ub-Lys48 chains are responsible for the recognition of cytosolic proteins by the proteasome (6). In the case of plasma membrane proteins, it has been shown that Ub-Lys63 chains play a role in the internalization of the uracil (7) and of the general amino acid permeases (22), two 12-transmembrane segment (12-TMS) proteins. However, monoubiquitination is sufficient for internalization of the  $\alpha$ -factor receptor (23), a 7-TMS protein. It has been postulated that the different ubiquitination requirements for internalization of these two types of plasma membrane proteins might be related to the differences in their size and the TMS number (23).

To test this hypothesis, we have examined the type of ubiquitination required for internalization of another 12-TMS protein, the maltose transporter. This transporter is internalized and degraded in the vacuole during nitrogen starvation when a fermentable carbon source is present (12, 14, 18). This process requires the binding of Ub and the action of both Ub ligase Npi1/Rsp5 and Ub-protein hydrolase Doa4/Npi2 (13, 15). Free Ub is present at low levels in cells lacking Doa4p (16). For this reason, internalization of plasma membrane proteins is substantially reduced in *Δdoa4* mutant cells (7, 13, 15, 22, 23). Based on the fact that this phenotype can be complemented with an overproduction of Ub (7, 22, 23), we investigated the effect of overexpressing mutant Ubs carrying Lys→Arg muta-

tions, which prevent the formation of various kinds of Ub chains in *Δdoa4* cells.

The following strains and plasmids were used: MHY501 (*MAT $\alpha$  DOA4 his3- $\Delta$ 200 leu2-3,112 ura3-52 lys2-801 trp1-1*) and its isogenic *doa4::LEU2* derivative, MHY623 (16); RH268-1C (*MAT $\alpha$  end4 ura3 leu2 his4 bar1-1*) (17); pRM1-1, a multicopy plasmid, which carries the *MAL1* locus (19); YE96, which contains a synthetic yeast Ub gene under the control of the copper-inducible *CUP1* promoter (5); plasmids derived from YE96 that encode mutant Ubs, in which distinct lysines (Lys29 [pUbK29R] [5], Lys48 [pUbK48R] [9], and Lys63 [pUbK63R] [5]), all three lysines (Lys29, -48, and -63 [pUbRRR] [5]), and all seven lysines (Lys6, -11, -27, -29, -33, -48, and -63 [pUb-no-Lys] [23]) have been replaced by arginine; and pLP2, also derived from YE96, encoding a *c-myc* epitope attached to the amino terminus of Ub (9).

Yeast cells were grown in YNB minimal medium with 2% maltose as previously described (13). Growth was followed by measuring the optical density at 640 nm. To trigger endocytosis, cells were harvested during early exponential growth (about 0.5 mg [dry weight] per ml), washed, and suspended in an ammonium-free medium containing 2% glucose as previously described (18). Endocytosis of the transporter was determined at different times of incubation by monitoring two steps: internalization and degradation. Internalization was determined by following the decrease in the rate of transport activity with radioactive maltose (18), and degradation was determined by immunoblotting cellular extracts with anti-transporter polyclonal antibodies (18). For anti-Ub immunoblot analysis, samples were suspended in Laemmli buffer, boiled for 5 min, and resolved by using sodium dodecyl sulfate-15% polyacrylamide gels in a Tricine system (20) before transfer to an Immobilon-P membrane.

**Overexpression of Ub partially restored endocytosis of the maltose transporter in *Doa4p*-deficient cells.** Overexpression of Ub was achieved by transforming with a multicopy plasmid bearing the Ub gene under the control of the inducible *CUP1* promoter (5) and growing the cells in the presence of 0.1 mM CuSO<sub>4</sub>. We found that overexpression of Ub had no effect on the internalization (Fig. 1A) or the degradation of the maltose transporter in wild-type cells (Fig. 1B). However, as previously reported (15), in *Δdoa4* mutant cells overexpression of Ub substantially increased the rate of both processes (Fig. 1C and D). Control experiments performed in parallel (Fig. 2) demonstrated overproduction of Ub in wild-type and mutant cells as well as the availability of free Ub in the cells during the 5 h of the endocytosis experiments (Fig. 1). The inability of Ub

\* Corresponding author. Mailing address: Instituto de Investigaciones Biomédicas "Alberto Sols," CSIC-UAM, Arturo Duperier 4, 28029 Madrid, Spain. Phone: 34-91-5854614. Fax: 34-91-5854587. E-mail: Rlagunas@ib.uam.es.

AUTHOR:  
SEE QUERY  
PAGE \_\_\_\_\_

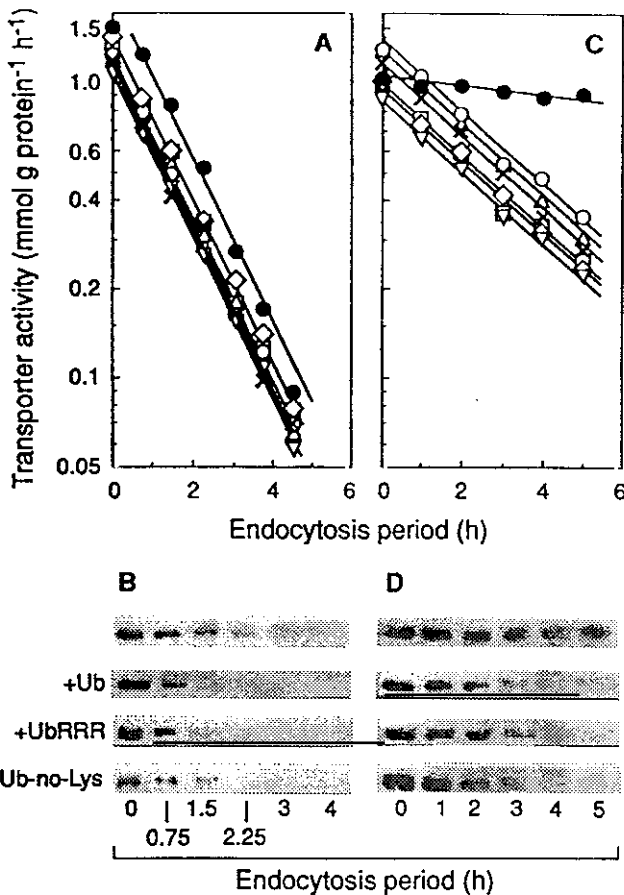


FIG. 1. Overexpression of wild-type Ub and of Ub mutants with mutations in the lysine residues partially restored endocytosis of the maltose transporter in Doa4p-deficient cells. MHY501 (wild type) (A and B) and MHY623 ( $\Delta$ doa4) cells (C and D) transformed with the plasmid pRM1-1 carrying the *MAL1* locus (●) or transformed with both pRM1-1 and YE96 carrying the wild-type Ub gene (○) or with pUbK29R (×), pUbK48R (△), pUbK63R (▽), pUbRRR (□), or pUb-no-Lys (◇) were harvested during early exponential growth, washed, and suspended in the endocytosis medium. After incubation at 30°C for the indicated times, the cells were harvested and maltose transport activity was determined (A and C). Data are mean values of two experiments. The results of the two experiments differed by less than 10%. The maltose transporter was detected by immunoblotting aliquots containing 30  $\mu$ g of protein of cellular extracts obtained at the indicated times (B and D).

overexpression to completely restore endocytosis is explained by the multiple abnormalities observed in Doa4p-deficient cells which are not related to the lack of free Ub (16).

**Overexpression of mutant Ubs with mutations in Lys29, -48, and -63 restored endocytosis in Doa4p-deficient cells.** To determine if any of the three Ub chains detected in vivo (1, 6, 11, 21) is involved in endocytosis of the transporter, the cells were transformed with plasmids encoding Ub mutants carrying Lys $\rightarrow$ Arg mutations in Lys29, -48, and -63. Overproduction of these Ub mutants restored maltose transporter internalization (Fig. 1C) and degradation (data not shown) in  $\Delta$ doa4 mutant cells as efficiently as overproduction of wild-type Ub (Fig. 1C and D). No such effect was observed in *DOA4* wild-type cells (Fig. 1A). These results suggest that Ub chains linked through Lys29, -48, and -63 are not involved in the internalization of the maltose transporter. This conclusion is supported by the fact that internalization (Fig. 1C) and degradation of the transporter (Fig. 1D) were also restored by overproduction of a

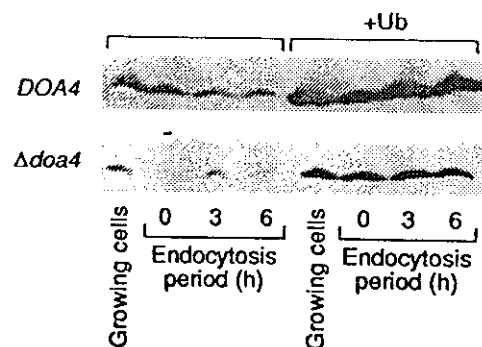


FIG. 2. Overexpression of Ub in wild-type and Doa4p-deficient cells. MHY501 (wild type) and MHY623 ( $\Delta$ doa4) cells transformed, when indicated, with the plasmid YE96 containing the yeast Ub gene were harvested during exponential growth, washed, and suspended in the endocytosis medium. Ub was detected by immunoblotting aliquots containing 30  $\mu$ g of protein of cellular extracts obtained at the indicated times.

triple Ub mutant carrying mutations in all three lysine residues.

**Overexpression of a mutant Ub lacking all of its seven lysine residues also restored endocytosis in Doa4p-deficient cells.** Ub chains linked through Lys6 and -11 have been observed in vitro (2). A role of these chains in vivo might be possible since they are able to bind to subunit 5S of the human 26S proteasome with affinities comparable to chains linked through Lys48 (2). To investigate if these Ub chains or Ub chains linked through Lys27 or -33 are involved in endocytosis of the maltose transporter, a plasmid encoding a mutant Ub lacking all of its seven lysine residues (Ub-no-Lys) was used. Overexpression of this mutant Ub had no effect in *DOA4* wild-type cells (Fig. 1A and B), whereas in  $\Delta$ doa4 mutant cells it restored internalization (Fig. 1C) and degradation of the transporter (Fig. 1D) as efficiently as overexpression of wild-type Ub (Fig. 1C and D). This demonstrated that endocytosis of the transporter did not require binding of any type of Ub chains and suggested that binding of a single Ub molecule to one or more lysine residues within the transporter served as an internalization signal.

In order to detect binding of Ub to the maltose transporter, a temperature-sensitive *end4* mutant strain (17) was used. End4p-deficient cells show a slow down in internalization and degradation of the transporter at 35°C (18), and therefore, enhanced levels of putative ubiquitinated species of the maltose transporter could be present in these cells. The mutant strain was transformed with a multicopy plasmid encoding a *c-myc*-tagged Ub allele (9). As in previous work (7, 9, 15), this tagged Ub allele was used to increase the differences in size between the ubiquitinated species. As in similar experiments performed with End3p-deficient cells (15), a band 7 to 9 kDa greater than the one corresponding to the transporter appeared in the immunoblots of samples collected 1 h after the transfer of the cells to 35°C under endocytosis conditions (data not shown). The appearance of this band, which was not observed in cells growing exponentially at 24°C or in cells harvested immediately after suspension in the endocytosis medium, was consistent with the presence of a monoubiquitinated form of the transporter in *end4* cells. It should be noted that this form of the transporter did not appear in  $\Delta$ doa4 cells (data not shown) in which free Ub was not available.

The results herein indicate that monoubiquitination, i.e., binding of a single Ub molecule to one or more lysine residues of the maltose transporter, signals maximal internalization of this protein and support the view that monoubiquitination is

the basic unit for triggering internalization of plasma membrane proteins. In some cases, i.e., the maltose transporter (this work) and the  $\alpha$ -factor receptor (23), this basic unit is sufficient for promoting a maximal internalization rate, whereas in other cases, i.e., the uracil permease (7) and the general amino acid permease (22), maximal internalization requires additional binding of Ub-Lys63 chains. It has been speculated that this additional requirement of the permeases could be related to their high TMS number and sizes (12-TMS and about 72 and 66 kDa, respectively). Compared with the  $\alpha$ -factor receptor (7-TMS and about 48 kDa), the permeases could, for steric reasons, require longer Ub chains to interact with the endocytic machinery or merely to provide more binding sites for a putative interacting protein (23). However, this possibility is unlikely as the maximal internalization rate of the maltose transporter (a 12-TMS protein of about 68 kDa) did not show this additional requirement.

Formation of specific Ub-Ub linkages is thought to be a property of Ub-protein ligases (E3) in association with Ub-conjugating enzymes (E2) (2, 10, 11). It has been shown that a complex formed by Ufd4p (E3) and Ubc4p and Ubc5p (E2) plays a role in the binding of Ub-Lys29 to certain proteins (11) and also that a complex formed by Ubrp1p (E3) and Rad6p (E2) plays a role in the binding of Ub-Lys48 chains to substrates of the N-end rule (4). In the case of Ub-Lys63 chains, it has been speculated that their binding to plasma membrane proteins could be a result of the action of Npi1p (E3) in association with E2 enzymes not yet identified (7, 22). This was based on the observation that internalization of the uracil and the general amino acid permeases, which is stimulated by binding of Ub-Lys63 chains, requires Npi1p. However, the fact that internalization of the maltose transporter, which is not stimulated by binding of Ub-Lys63 chains, also requires this E3 enzyme (13, 15) seems to rule out this possibility.

In conclusion, the results presented in this paper indicate that monoubiquitination is sufficient to promote a maximal internalization rate of the 12-TMS maltose transporter. This modification is similar to that required for the 7-TMS  $\alpha$ -factor but different from that required for the 12-TMS uracil and general amino acid permeases. This indicates that monoubiquitination is not specific for the 7-TMS proteins and that binding of Ub-Lys63 chains is not a general requirement for the maximal internalization rate of the 12-TMS proteins.

We are very grateful to M. Herweijer for the gift of the polyclonal antibodies against the maltose transporter, to B. J. Ecker, M. Ellison, L. Hicke, M. Hochstrasser, H. Riezman, and R. Rodicio for the gift of plasmids and strains, to A. Fernández and J. Pérez for help in the preparations of figures, and to J. M. Gancedo and D. Jones for critical reading of the manuscript.

This work was supported by the Spanish Dirección General Científica y Técnica (PB97-1213-CO2-01).

#### REFERENCES

1. Arnason, T., and M. J. Ellison. 1994. Stress resistance in *Saccharomyces cerevisiae* is strongly correlated with assembly of a novel type of multiubiquitin chain. *Mol. Cell. Biol.* 14:7876-7883.
2. Baboshina, O. V., and A. L. Haas. 1996. Novel multiubiquitin chain linkages catalyzed by the conjugating enzymes E2EPF and RAD6 are recognized by 26 S proteasome subunits. *J. Biol. Chem.* 271:2823-2831.
3. Ciechanover, A. 1998. The ubiquitin-proteasome pathway: on protein death and cell life. *EMBO J.* 17:7151-7160.
4. Dohmen, J. D., K. Madura, B. Bartel, and A. Varshavsky. 1991. The N-end rule is mediated by the UBC2 (RAD6) ubiquitin-conjugating enzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:7351-7355.
5. Eckner, D. J., M. Ishaq Khan, J. Marsh, T. R. Butt, and S. T. Crooke. 1987. Chemical synthesis and expression of a cassette adapted ubiquitin gene. *J. Biol. Chem.* 262:3524-3527.
6. Finley, D., S. Sadis, B. P. Monia, P. Boucher, D. J. Eckner, S. T. Crooke, and V. Chau. 1994. Inhibition of proteolysis and cell cycle progression in a multiubiquitination-deficient yeast mutant. *Mol. Cell. Biol.* 14:5501-5509.
7. Galan, J. M., and R. Haguenaer-Tsapis. 1997. Ubiquitin Lys63 is involved in ubiquitination of a yeast plasma membrane protein. *EMBO J.* 16:5847-5854.
8. Hicke, L. 1999. Gettin' down with ubiquitin: turning off cell-surface receptors, transporters and channels. *Trends Cell Biol.* 9:107-112.
9. Hochstrasser, M., M. J. Ellison, V. Chau, and A. Varshavsky. 1991. The short-lived MATa2 transcriptional regulator is ubiquitinated *in vivo*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:4606-4610.
10. Jentsch, S. 1992. The ubiquitin-conjugation system. *Annu. Rev. Genet.* 26:179-207.
11. Johnson, E. S., P. C. M. Ma, I. M. Ota, and A. Varshavsky. 1995. A proteolytic pathway that recognizes ubiquitin as a degradation signal. *J. Biol. Chem.* 270:17442-17456.
12. Lucero, P., M. Herweijer, and R. Lagunas. 1993. Catabolite inactivation of the yeast maltose transporter is due to proteolysis. *FEBS Lett.* 333:165-168.
13. Lucero, P., and R. Lagunas. 1997. Catabolite inactivation of the yeast maltose transporter requires ubiquitin-ligase npi1/rsp5 and ubiquitin-hydrolase npi2/doa4. *FEMS Microbiol. Lett.* 147:273-277.
14. Medintz, I., H. Jiang, E. K. Han, W. Cui, and C. A. Michels. 1996. Characterization of the glucose-induced inactivation of maltose permease in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* 178:2245-2254.
15. Medintz, I., H. Jiang, and C. A. Michels. 1998. The role of ubiquitin conjugation in glucose-induced proteolysis of *Saccharomyces cerevisiae* maltose permease. *J. Biol. Chem.* 273:34454-34462.
16. Papa, F. R., and M. Hochstrasser. 1993. The yeast DOA4 gene encodes a desubiquitinating enzyme related to a product of the human tre-2 oncogene. *Nature* 366:313-319.
17. Raths, S., J. Rohrer, F. Crausaz, and H. Riezman. 1993. *end3* and *end4*: two mutants defective in receptor-mediated endocytosis in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Biol.* 120:55-65.
18. Riballo, E., M. Herweijer, D. H. Wolf, and R. Lagunas. 1995. Catabolite inactivation of the yeast maltose transporter occurs in the vacuole after internalization by endocytosis. *J. Bacteriol.* 177:5622-5627.
19. Rodicio, R. 1986. Insertion of non-homologous DNA sequences into a regulatory gene causes a constitutive maltase synthesis in yeast. *Curr. Genet.* 11:235-241.
20. Schägger, H., and G. von Jagow. 1987. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal. Biochem.* 166:368-379.
21. Spence, J., S. Sadis, A. L. Hass, and D. Finley. 1995. A ubiquitin mutant with specific defects in DNA repair and multiubiquitination. *Mol. Cell. Biol.* 15:1265-1273.
22. Springael, J. I., J. M. Galan, R. Haguenaer-Tsapis, and B. André. 1999. NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-induced down-regulation of the *Saccharomyces cerevisiae* Gap1p permease involves its ubiquitination with lysine-63-linked chains. *J. Cell Sci.* 112:1375-1383.
23. Terrell, J., S. Shih, R. Dunn, and L. Hicke. 1998. A function for monoubiquitination in the internalization of a G protein-coupled receptor. *Mol. Cell Biol.* 18:193-202.







ELSEVIER

FEMS Microbiology Letters 166 (1998) 317–324

**FEMS**  
MICROBIOLOGY  
LETTERS

## Catabolite inactivation of the maltose transporter in nitrogen-starved yeast could be due to the stimulation of general protein turnover

Élida Peñalver, Pilar Lucero, Eulalia Moreno, Rosario Lagunas \*

*Instituto de Investigaciones Biomédicas, CSIC, Arturo Duperier, 4, 28029 Madrid, Spain*

Received 23 July 1998; accepted 28 July 1998

### Abstract

Addition of glucose to *Saccharomyces cerevisiae* inactivates the maltose transporter. The general consensus is that this inactivation, called catabolite inactivation, is one of the control mechanisms developed by this organism to use glucose preferentially whenever it is available. Using nitrogen-starved cells (resting cells), it has been shown that glucose triggers endocytosis and degradation of the transporter in the vacuole. We now show that maltose itself triggers inactivation and degradation of its own transporter as efficiently as glucose. This fact, and the observation that glucose inactivates a variety of plasma membrane proteins including glucose transporters themselves, suggests that catabolite inactivation of the maltose transporter in nitrogen-starved cells is not a control mechanism specifically directed to ensure a preferential use of glucose. It is proposed that, in this metabolic condition, inactivation of the maltose transporter might be due to the stimulation of the general protein turnover that follows nitrogen starvation. © 1998 Federation of European Microbiological Societies. Published by Elsevier Science B.V. All rights reserved.

*Keywords:* Maltose transporter; Catabolite inactivation; Protein turnover; *Saccharomyces cerevisiae*

### 1. Introduction

The addition of glucose to yeast cells using other sugars in the presence (growing cells) or in the absence (resting cells) of a nitrogen source inhibits uptake of these sugars by inactivating their transporters [1–3]. Using resting cells, it has been shown that this inactivation, called catabolite inactivation, is due to proteolysis of the transporters [4] that occurs in the vacuole after internalisation by endocytosis [1–3].

This event requires actin microfilaments [5] and ubiquitin probably as an endocytic marker [3,6]. In addition, in the case of the maltose transporter a phosphorylation has been detected, the role of which is still unknown [2]. This phosphorylation appears to be independent of the cAMP-dependent protein kinase [7].

It is believed that the inactivation of sugar transporters by glucose is one of the control mechanisms developed by yeast to ensure a preferential use of glucose whenever this sugar is available in the growth medium. This implies that the inactivation is, to some extent, specific for non-glucose sugar

\* Corresponding author: Tel.: +34 (91) 5854614;  
Fax: +34 (91) 5854587; E-mail: rlagunas@iib.uam.es

transporters. However, the evidence obtained with nitrogen-starved cells shows that glucose inactivates, by a similar endocytic mechanism, all plasma membrane proteins so far tested, i.e. the uracil [8] and K<sup>+</sup> [9] permeases, the H<sup>+</sup>-ATPase [10] and all sugar transporters [1–3] including some of the glucose transporters themselves. This latter conclusion is inferred from the irreversible decrease in glucose transport which is observed upon addition of glucose to nitrogen-starved cells [11,12] which requires endocytosis [9].

In this work we investigated if catabolite inactivation of the maltose transporter was specifically supported by glucose and if other sugars were able to support the inactivation with a similar efficiency. We measured transport activity with radioactive maltose and degradation of the transporter with polyclonal antibodies. We found that maltose itself triggered inactivation of its own transporter as efficiently as glucose. This result and the observation that glucose inactivates a variety of plasma membrane proteins, including glucose transporters themselves, strongly indicate that in resting cells catabolite inactivation of the maltose transporter is not a control mechanism specifically directed to ensure a preferential use of glucose. Rather, it is proposed that in these cells inactivation of sugar transporters, as well as inactivation of other plasma membrane proteins, might be due to the stimulation of general protein turnover that follows nitrogen starvation.

## 2. Materials and methods

Strains ATCC 42407 (*MATa suc<sup>-</sup> MAL GAL*) and X106 3D (*MATa Gal80 his1 ura3*) [13] were used. The cells were grown aerobically at 30°C in a rotary shaker (200 rpm) in a medium containing 2% peptone, 1% yeast extract and 2% maltose. Cell growth was monitored by measuring optical densities at 640 nm. To start the inactivation, cells were harvested during exponential growth (about 0.7 mg dry weight per ml), washed and resuspended in 3 volumes of an ammonium-free medium as described previously [12] in the presence of a 2% carbon source, as indicated in each experiment, and 500 mg of tetracycline chlorohydrate per litre was added to avoid bacterial contamination. The suspension was incubated at 30°C in a rotary shaker (200 rpm). Maltose transport was determined using radioactive maltose as described previously [1]. Degradation of the transporter was followed with polyclonal antibodies using crude cellular extracts. Samples containing 20 µg protein were resolved by 10% SDS-PAGE and the maltose transporter visualised using ECL chemiluminescence detection as previously described [5]. Fermentation and respiration were measured at 30°C by a conventional manometric method as described previously [11]. Sampling of the cells and determination of ATP was performed as described previously [11].

Table 1  
Fermentation and respiration rate during the inactivation

Inactivation period (h)	Strain ATCC 42407 <sup>a</sup>				Strain X106-3D <sup>b</sup>			
	Fermentation <sup>c</sup>		Respiration <sup>d</sup>		Fermentation <sup>c</sup>		Respiration <sup>d</sup>	
	Glucose	Maltose	Glucose	Maltose	Glucose	Galactose	Glucose	Galactose
0.5	24	22	1.0	1.1	20	12	0.5	0.42
1.0	22	16	0.95	1.1	20	12	0.49	0.48
1.5	19	12	1.0	1.2	19	11	0.49	0.45
2.0	17	9	1.1	1.2	18	10	0.50	0.43
2.5	16	7	1.0	1.1	18	10	0.50	0.45

<sup>a</sup>Strain ATCC 42407 was grown, washed and diluted in an inactivation medium containing glucose or maltose and cycloheximide as in Fig. 3B.

<sup>b</sup>Strain X107-3D was grown, washed and diluted in an inactivation medium containing galactose as in Fig. 1C.

<sup>c</sup>Fermentation rate was calculated considering that 1 mol of hexose fermented produced 2 mol of CO<sub>2</sub>.

<sup>d</sup>Respiration rate was calculated considering that 1 mol of hexose respired consumed 6 mol of O<sub>2</sub>.

Results are in mmol hexose g protein<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>. Data are mean values of two experiments. The results of the two experiments differed by less than 10%.

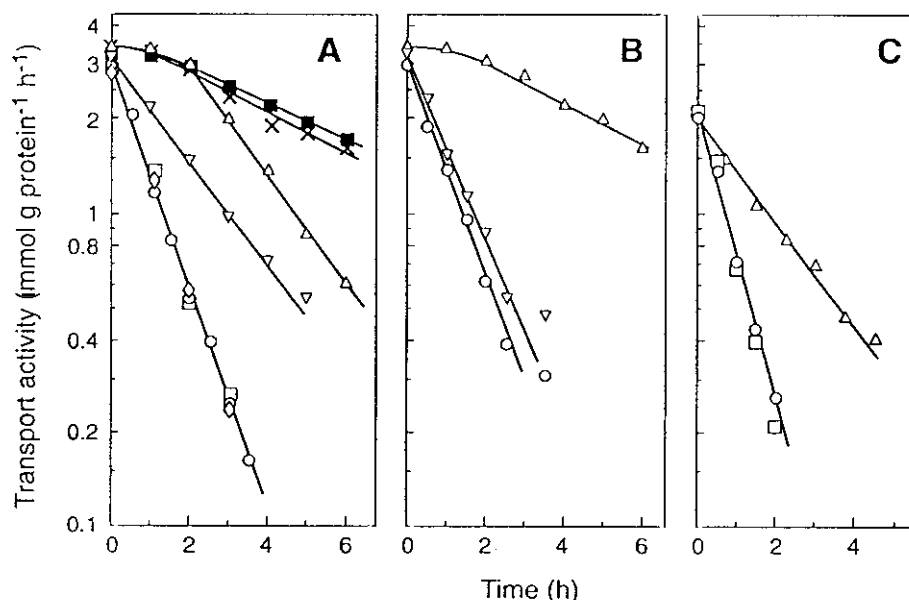


Fig. 1. Inactivation of the maltose transporter in the presence of several carbon sources. A,B: Strain ATCC 42407 (wild-type) was harvested during exponential growth on maltose and diluted three times, with respect to the growth volume, in an inactivation medium containing 2% glucose (○), fructose (□), mannose (◇), galactose (△), maltose (▽), ethanol (■), or without carbon source (×) in the absence (A) or in the presence (B) of  $10 \mu\text{g ml}^{-1}$  cycloheximide. C: Strain X106-3D (*GAL80*) was harvested and treated as above in the absence of cycloheximide. After incubation at  $30^\circ\text{C}$  for the indicated times the cells were harvested, washed and assayed for maltose transport activity. Data are mean values of two experiments. The results of the two experiments differed by less than 10%.

### 3. Results

#### 3.1. Inactivation of the maltose transporter in the presence of different carbon sources

The maltose transporter is inducible by maltose [14]. To test the effect of different carbon sources on its activity, cells were grown with maltose, collected during exponential growth and resuspended in a medium without a carbon and nitrogen source [12]. Addition of glucose, fructose or mannose to this medium triggered the inactivation of the transporter at a constant rate with a half-life for the transporter of about 1 h (Fig. 1A). When, instead of these hexoses, galactose was added, a delay of about 2 h in the start of the inactivation was observed. Thereafter inactivation took place at a rate which indicated a half-life for the transporter of about 2 h (Fig. 1A). In agreement with previous findings [2,4] a much lower rate of inactivation, half-life  $> 10$  h, was observed in the presence of ethanol or in the absence of an external carbon source (Fig. 1A).

Maltose-grown cells constitutively use glucose, fructose and mannose, the three sugars transported by the glucose transport system [14]. However, utilisation of galactose requires an adaptation period because catabolism of this sugar requires induction by galactose of several proteins [14]. Therefore the delay in the inactivation of the transporter observed in the presence of galactose (Fig. 1A) could have been due to this requirement. If this possibility is correct three predictions should be met: (i) in the experimental conditions used, i.e. in the absence of an external nitrogen source and in the presence of galactose, some induction of the galactose catabolism would take place from the internal stock of amino acids. (ii) Cycloheximide would inhibit this induction and, consequently, would prevent the inactivation by galactose. This would not be the case for the inactivation by glucose. (iii) A mutant constitutively active for galactose catabolism would not show a delay in the start of inactivation. The results obtained met all these predictions. During the first 3–4 h of nitrogen starvation in the presence of gal-

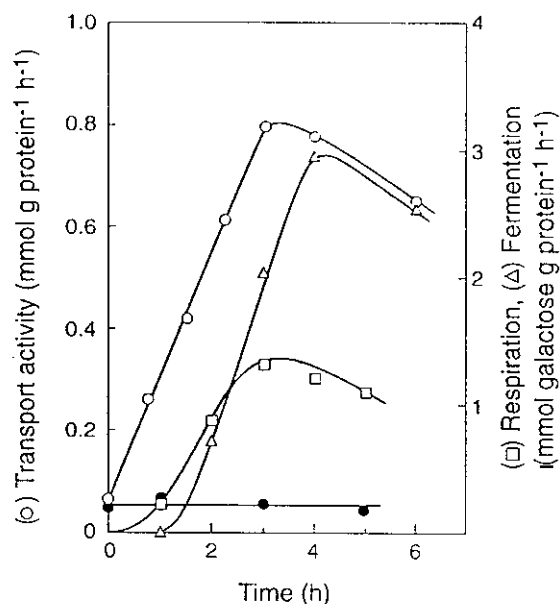


Fig. 2. Induction of transport, fermentation and respiration of galactose under inactivating conditions. Strain ATCC 42407 was harvested during exponential growth on maltose, washed and diluted in three volumes of the inactivation medium in the presence of 2% galactose in the absence (open symbols), or in the presence of  $10 \mu\text{g ml}^{-1}$  cycloheximide (closed symbols). After incubation at  $30^\circ\text{C}$  for the indicated times transport (circles), fermentation (triangles) and respiration (squares) of galactose were measured.

actose, an induction of transport, fermentation and respiration of galactose was detected (Fig. 2). The addition of cycloheximide blocked this induction (Fig. 2) as well as the capacity of galactose to trigger the maltose transporter inactivation (Fig. 1B). Finally the delay in the start of inactivation disappeared with a constitutive galactose metabolism (Fig. 1C). These results show that galactose is able to inactivate the maltose transporter although at a lower rate than that seen with the other hexoses tested.

The addition of maltose to nitrogen-starved cells also inactivated the maltose transporter and the rate of inactivation was lower than that observed with glucose (Fig. 1A). However, in the presence of maltose, two processes may have been taking place during the inactivation experiments: induction of the maltose transporter, synthesised from the internal stock of amino acids, and inactivation of the existing transporter triggered by the removal of the nitrogen source. The simultaneous occurrence of these two opposite processes would result in an apparent decrease in the rate of inactivation. To measure the actual rate of inactivation we added cycloheximide to inhibit induction of the transporter. In the presence of the inhibitor, maltose and glucose inactivated the transporter at a similar rate (Fig. 1B) showing that the two sugars were equally efficient in supporting the inactivation.

Table 2

Cellular concentration of ATP and theoretical rate of ATP production in catabolism during the inactivation

Inactivation period (h)	Strain ATCC 42407 <sup>a</sup>			Strain X106-3D <sup>b</sup>					
	ATP concentration <sup>b</sup> (mM)			ATP production <sup>c</sup> (mmol g protein <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )		ATP concentration <sup>b</sup> (mM)		ATP production <sup>c</sup> (mmol g protein <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )	
	Glucose	Maltose	Ethanol	Glucose	Maltose	Glucose	Galactose	Glucose	Galactose
0.5	1.2	1.1	1.1	72	70	1.1	1.1	52	34
1.0	ND	ND	ND	67	58	ND	ND	52	36
1.5	1.2	1.2	1.0	62	53	1.1	1.2	50	33
2.0	ND	ND	ND	60	47	ND	ND	48	30
2.5	1.2	1.2	1.1	56	40	1.1	1.2	48	31

<sup>a</sup>Cells were grown and treated as in Table 1.

<sup>b</sup>Cellular ATP concentration was determined as described in Section 2. Data are mean values of two experiments. The results of the two experiments differed by less than 10%. ND, not determined.

<sup>c</sup>The rate of ATP production was calculated from data on fermentation and respiration (Table 1) assuming that 2 mol of ATP are gained in the fermentation of 1 mol of hexose and a constant P/O ratio of 2 in the respiratory chain. With this assumption 24 mol ATP would be gained in the respiration of 1 mol of hexose.

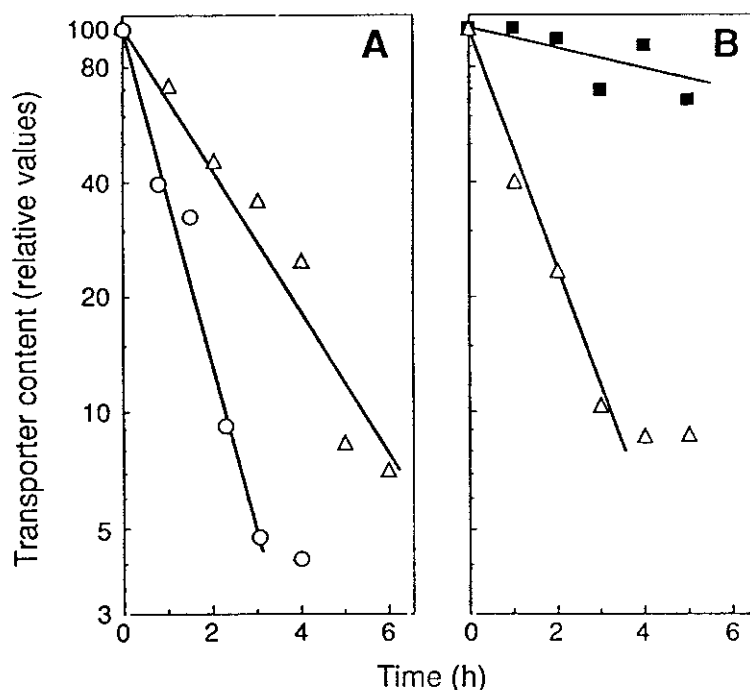


Fig. 3. Degradation of the maltose transporter in the presence of different carbon sources. A: Strain X106-3D (*GALS0*) was harvested during exponential growth, washed and diluted in three volumes of the inactivation medium containing 2% glucose (○) or galactose (△). B: Strain ATCC 42407 was harvested and diluted as above in the inactivation medium containing 2% maltose (△) or ethanol (■) and 10 µg ml<sup>-1</sup> cycloheximide. After incubation at 30°C for the indicated times the maltose transporter was detected by immunoblotting of cellular extracts.

### 3.2. Degradation of the maltose transporter in the presence of different carbon sources

Catabolite inactivation of the maltose transporter in resting cells is due to endocytosis followed by degradation of the transporter in the vacuole [1,2]. In some strains, superimposed on this irreversible inactivation, there is an inhibition of the transport activity which is not due to degradation of the transporter and the nature of which is unknown [2]. To investigate if in our experiments inactivation was followed by degradation, an estimation of the cellular content of the transporter was performed using polyclonal antibodies. The results obtained yielded half-life values for the transporter similar to those calcu-

lated from transport experiments, i.e. about 1 h in the presence of glucose or maltose and 2 and > 10 h, respectively, in the presence of galactose or ethanol (Fig. 3). We conclude, therefore, that in our experiments inactivation was followed by degradation of the transporter.

### 3.3. Correlation between the rate of inactivation and energy catabolism

The results shown above indicate that the ability of the energy sources to support inactivation increased in the following order: ethanol < galactose < maltose = glucose = fructose = mannose. This order parallels the rates at which these substrates are

fermented by yeast cells [15]. Therefore one possibility is that the rate of fermentation determines the rate of inactivation. The results ruled out this possibility because we found that fermentation of sugars progressively decreased during a period in which the rate of inactivation was constant (Table 1). Particularly relevant is the fact that a constant half-life for the transporter was observed (Fig. 1B) when the fermentation rate of maltose was decreased by more than 70% (Table 1). It should be noted that the observed decline in fermentation is consistent with previous findings and has been ascribed to the decline in sugar uptake occurring upon nitrogen starvation [11].

It is well known that several steps of degradation of plasma membrane proteins in the vacuole, such as binding of ubiquitin and traffic and fusion of endocytic vesicles require energy. Therefore, another possibility is that the ATP concentration in the cells determines the rate of inactivation. The results obtained ruled out this possibility since the intracellular concentration of ATP was similar with all energy sources tested (Table 2). Alternatively, the rate of inactivation might depend on the rate of ATP production in catabolism. To check this possibility the theoretical rate of ATP production was calculated (Table 2) from data of fermentation and respiration of sugars (Table 1). Neither in this case a correlation with the rate of inactivation was apparent and particularly relevant is the fact that a constant rate of inactivation was detected in the presence of maltose (Fig. 1B), when the theoretical rate of ATP production decreased by more than 40% (Table 2). In spite of these facts, the possibility that energy metabolism determines the rate of inactivation cannot be ruled out. In the calculations of Table 2, a constant P:O ratio of 2 in respiration was assumed but this assumption may be incorrect since the efficiency of the respiratory chain *in vivo* is unknown and there is evidence indicating that it may greatly change depending on a number of factors [16].

#### 4. Discussion

Yeast cells use glucose preferentially to any other carbon source whenever this sugar is available in a growth medium. It is well established that this pref-

erential growth is ensured by three control mechanisms triggered by glucose: induction of glucose transporters [17], repression [18] and inactivation of several proteins specifically required for catabolism of other substrates [19]. The general view is that sugar transporters other than glucose transporters belong to the group of proteins which, in growing cells, are specifically inactivated to favour the use of glucose. In this work we analysed if, in resting cells, inactivation of the maltose transporter may also play this role. Accumulated evidence indicates that it does not. Two facts support this conclusion: (i) in nitrogen-starved cells inactivation of the maltose transporter is triggered even in the absence of glucose by sugars which, like maltose, may support the inactivation as efficiently as glucose (this work). (ii) In these cells, glucose inactivates all plasma membrane proteins so far tested [1–3,8–10], even those proteins which like glucose transporters are directly implicated in glucose utilisation [9,11,12]. It is known that catabolite inactivation of sugar transporters and of other plasma membrane proteins in resting cells is due to degradation of these proteins in the vacuole [1–3,8]. It is also known that nitrogen starvation is the most influencing factor among the variety of factors which stimulate protein degradation [20,21]. Therefore, the inactivation of sugar transporters as well as of other plasma membrane proteins observed in resting cells might be due, not to a control mechanism specifically directed to ensure a preferential use of glucose, but to the stimulation of the general protein turnover that follows nitrogen starvation and that supplies the amino acids required for the stress response [22].

Degradation of plasma membrane proteins is a very complex process which includes binding of ubiquitin [3,6], interaction with cytoskeleton elements and other cytoplasmic proteins [5], formation of primary and secondary endosomes as well as traffic and fusion of endosomes with the vacuole [1–3,8]. The fact that most of these steps require energy easily explains why inactivation of the maltose transporter is stimulated by the presence of an energy source. However, the reason why the rate of inactivation changes depending on the energy source present is not clear. Neither it is clear why other cellular processes requiring energy also change depending on the energy source. For instance, growth

rate and growth yield are two cellular processes which, as inactivation of the maltose transporter, change with the energy source present in the medium (for a review see [23]). In the case of these processes, as in the case of inactivation, an apparent correlation with the cellular ATP concentration or the calculated ATP production in catabolism is not apparent. In spite of this, the general idea is that yeast growth rate and growth yield are dependent on the rate and amount of ATP produced by catabolism [23]. A similar dependence may also be envisaged in the case of the maltose transporter inactivation but a demonstration of this possibility is difficult at present because, although our knowledge on the control an energy efficiency of the respiratory chain has greatly increased in recent years, the question of ATP production by yeast cells in vivo remains unsolved [16].

In conclusion, the available evidence suggests that the so-called catabolite inactivation of the maltose transporter in nitrogen-starved cells is not a control mechanism specifically directed to ensure a preferential use of glucose but a consequence of the stimulation of general protein turnover that follows nitrogen starvation. As far as growing cells are concerned, it should be emphasised that the inactivation of sugar transporters has been almost exclusively investigated in resting cells and that a re-examination of its role and mechanism in growing conditions could be worthwhile.

#### Acknowledgments

We are very grateful to M. Herweijer for the gift of the polyclonal antibodies against the maltose transporter, to J. Pérez and A. Fernández for help in the preparation of figures and to C. Gancedo and J.M. Gancedo for critical reading of the manuscript. This work was supported by the Spanish Dirección General Científica y Técnica (PB 94-0091) and by the European Commission (BIO4-CT95-0107).

#### References

- [1] Riballo, E., Herweijer, M., Wolf, D.H. and Lagunas, R. (1995) Catabolite inactivation of the yeast maltose transporter occurs in the vacuole after internalization by endocytosis. *J. Bacteriol.* 177, 5622–5627.
- [2] Medintz, I., Jiang, H., Han, E.K., Cui, W. and Michels, C.A. (1996) Characterization of the glucose-induced inactivation of maltose permease in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* 178, 2245–2254.
- [3] Horak, J. and Wolf, D.H. (1997) Catabolite inactivation of the galactose transporter in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: ubiquitination, endocytosis and degradation in the vacuole. *J. Bacteriol.* 179, 1541–1549.
- [4] Lucero, P., Herweijer, M. and Lagunas, R. (1993) Catabolite inactivation of the yeast maltose transporter is due to proteolysis. *FEBS Lett.* 333, 165–168.
- [5] Peñalver, E., Ojeda, L., Moreno, E. and Lagunas, R. (1997) Role of the cytoskeleton in endocytosis of the yeast maltose transporter. *Yeast* 13, 541–549.
- [6] Lucero, P. and Lagunas, R. (1997) Catabolite inactivation of the yeast maltose transporter requires ubiquitin-ligase *npi1/rsp5* and ubiquitin-hydrolase *npi2/doa4*. *FEMS Microbiol. Lett.* 147, 273–277.
- [7] Riballo, E., Mazón, M.J. and Lagunas, R. (1994) cAMP-dependent protein kinase is not involved in catabolite inactivation of the transport of sugars in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim. Biophys. Acta* 1192, 143–146.
- [8] Volland, C., Urban-Grimal, D., Géraud, G. and Haguenaer-Tsapis, R. (1994) Endocytosis and degradation of the yeast uracil permease under adverse conditions. *J. Biol. Chem.* 269, 9833–9841.
- [9] Riballo, E. and Lagunas, R. (1994) Involvement of endocytosis in catabolite inactivation of the K<sup>+</sup> and glucose transport systems in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol. Lett.* 121, 77–80.
- [10] Benito, B., Moreno, E. and Lagunas, R. (1991) Half-life of the plasma membrane ATPase and its activating system in resting yeast cells. *Biochim. Biophys. Acta* 1063, 265–268.
- [11] Lagunas, R., Dominguez, C., Busturia, A. and Sáez, M.J. (1982) Mechanisms of appearance of the Pasteur effect in *Saccharomyces cerevisiae*: inactivation of sugar transport systems. *J. Bacteriol.* 152, 19–25.
- [12] Busturia, A. and Lagunas, R. (1986) Catabolite inactivation of the glucose transport system in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Gen. Microbiol.* 132, 379–385.
- [13] Nevado, J. and Heredia, C.F. (1996) Galactose induces in *Saccharomyces cerevisiae* sensitivity of the utilization of hexoses to inhibition by D-glucosamine. *Can. J. Microbiol.* 42, 6–11.
- [14] Bisson, L.F., Coons, D.M., Kruckeberg, A.L. and Lewis, D.A. (1993) Yeast sugar transporters. *Curr. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 28, 259–308.
- [15] Lagunas, R. (1979) Energetic irrelevance of aerobiosis for *Saccharomyces cerevisiae* growing on sugars. *Mol. Cell. Biochem.* 27, 139–146.
- [16] Sheldon, J.G., Williams, S.P., Fulton, A.M. and Brindle, K.M. (1996) <sup>31</sup>P NMR magnetization transfer study of the control of ATP turnover in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 639–644.
- [17] Özcan, S., Dover, J., Rosenwald, A.G., Wöfl, S. and John-

- ston, M. (1996) Two glucose transporters in *Saccharomyces cerevisiae* are glucose sensors that generate a signal for induction of gene expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 12428-12432.
- [18] Gancedo, J.M. (1992) Carbon catabolite repression in yeast. *Eur. J. Biochem.* 206, 297-313.
- [19] Holzer, H. (1989) Proteolytic catabolite inactivation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell. Biol. Rev.* 21, 305-319.
- [20] Betz, H. (1976) Inhibition of protein synthesis stimulates intracellular protein degradation in growing cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 72, 121-130.
- [21] Takeshige, K., Baba, M., Tsuboi, S., Noda, T. and Ohsumi, Y. (1992) Autophagy in yeast demonstrated with proteinase-deficient mutants and conditions for its induction. *J. Cell Biol.* 119, 301-311.
- [22] Ruis, E. and Schüller, C. (1995) Stress signaling in yeast. *BioEssays* 17, 959-965.
- [23] Gancedo, C. and Serrano, R. (1988) Energy-yielding metabolism. In: *The Yeasts* (Harrison, J.S. and Rose, H.A., Eds.), Vol. 3, pp. 205-251. Academic Press, New York.



Otras publicaciones.



## Moderate Concentrations of Ethanol Inhibit Endocytosis of the Yeast Maltose Transporter

PILAR LUCERO, ÉLIDA PEÑALVER, EULALIA MORENO, AND ROSARIO LAGUNAS\*

*Instituto de Investigaciones Biomédicas, CSIC, 28029-Madrid, Spain*

Received 22 July 1997/Accepted 27 July 1997

**The maltose transporter in *Saccharomyces cerevisiae* is degraded in the vacuole after internalization by endocytosis upon nitrogen starvation in the presence of a fermentable substrate. This degradation, known as catabolite inactivation, is inhibited by the presence of moderate concentrations (2 to 6%, vol/vol) of ethanol. We have investigated the mechanism of this inactivation and have found that it is due to the inhibition of the internalization of the transporter by endocytosis. The results also indicate that this inhibition is due to alterations produced by ethanol in the organization of the plasma membrane which also affects to endocytosis of other plasma membrane proteins. Apparently, endocytosis is particularly sensitive to these alterations compared with other processes occurring at the plasma membrane.**

The yeast maltose transporter is an intrinsic plasma membrane protein which is inactivated during nitrogen starvation in the presence of a fermentable substrate (2). This inactivation, known as catabolite inactivation, is due to a proteolysis of the transporter (22) that occurs in the vacuole after its internalization by endocytosis (24, 28). Endocytosis of the maltose transporter requires the ubiquitin pathway (23) and is partially dependent on actin microfilaments and independent of microtubules (27). During the studies on the role of the cytoskeleton in endocytosis of the maltose transporter, we used cytochalasin D to inhibit the formation of actin microfilaments (26). This inhibitor is insoluble in water, and we found that addition of moderate concentrations (2 to 6%, vol/vol) of the solvent, ethanol, to the cell suspension inhibited inactivation of the transporter. This observation seems most interesting, since ethanol may be present at high concentrations in normal yeast environments.

Sugars are the major carbon and energy source in yeast natural habitats as well as in industrial fermentations, and ethanol is the major product of sugar catabolism in this organism (18). As a consequence, ethanol may accumulate in yeast environments at concentrations which affect essential cellular functions, giving rise to toxic effects (for a review, see reference 14). However, compared with other eukaryotes, *Saccharomyces* spp. appears to be the most alcohol-resistant organism since it is able to grow in the presence of 8 to 12% (vol/vol) ethanol and to survive exposure to up to 15% (vol/vol) (14). This high ethanol resistance contrasts with the observed strong effect of ethanol on a relevant physiological process like sugar transport inactivation.

In this work, we have investigated the mechanism of the inhibition by ethanol of the catabolite inactivation of the yeast maltose transporter. It is shown that ethanol inhibits the first step of this inactivation, i.e., internalization of the transporter by endocytosis. This conclusion is based on two observations: the stabilization of the transport activity in the presence of ethanol and the permanence of the transporter at the plasma membrane. The results also indicate that the inhibition is due to changes occurring in the structure of the plasma membrane,

which also affect the endocytosis of other proteins. Apparently, endocytosis is particularly sensitive to these changes compared with other processes occurring at the plasma membrane.

### MATERIALS AND METHODS

**Reagents.** D-[U-<sup>14</sup>C]maltose, D-[U-<sup>14</sup>C]galactose, D-[U-<sup>14</sup>C]glucose, L-[U-<sup>14</sup>C]citulline, and enhanced chemoluminescence reagents were from Amersham International (Little Chalfont, United Kingdom). Enzymes and metabolites were from Sigma (St. Louis, Mo.). The goat Anti-rabbit antibody-peroxidase conjugate was from Biosource International (Camarillo, Calif.). All other reagents were of analytical grade.

**Yeast strains.** The following yeast strains were used: WCG4a (*MATa his3-11,15 leu2-3,112 ura3-Δ GAL<sup>+</sup> mal Can<sup>+</sup>*) (11), 5DBY 1869 (*MATa his4-619 mal ACT1 TUB2*) (25), ATCC 42407 (*MATa suc GAL MAL*), and 23346c (*MATa ura3*) (10). Strains WCG4a and 5DBY 1869 were transformed with the multicopy plasmid pRM1-1, which carries the *MAL1* locus (31). The transformed cells grew and transported maltose at rates the same as those of *mal<sup>+</sup>* wild-type strains.

**Growth conditions.** In experiments on maltose or galactose transporter inactivation, the cells were grown at 30°C in medium containing 2% peptone, 1% yeast extract, and 2% maltose or galactose in a rotatory shaker (200 rpm). When maltose was used, 3 ppm of antimycin A was added to the growth medium to inhibit respiration and therefore to favor plasmid expression by forcing the cells to ferment maltose. In experiments with the general amino acid permease, the cells were grown in yeast nitrogen base (YNB) minimal medium (pH 6.0) with 22 μg of uracil per ml and with 2% glucose and 0.1% proline as the carbon and nitrogen source, respectively (10). Cell growth was monitored by measuring the optical density at 640 nm.

**Subcellular fractionation in continuous sucrose gradient.** Cellular homogenate corresponding to 2.5 g of yeast (dry weight) was obtained as described previously (37). Crude extract is the supernatant obtained by centrifugation of the homogenate for 10 min at 700 × g. The soluble fraction and crude membrane fraction were, respectively, the supernatant and the pellet obtained by centrifugation of the crude extract for 20 min at 20,000 × g. The crude membrane fraction, suspended in 5 ml of 20% glycerol–10 mM Tricine-Tris (pH 7.5)–0.1 mM EDTA–0.1 mM dithiothreitol–1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), was applied to a continuous sucrose gradient. To prepare the gradient, 10-ml volumes each of 60, 40, and 20% (wt/vol) sucrose, dissolved in the buffer described above except for the absence of glycerol and PMSF, were layered in a tube of the SW28 rotor (Beckman) and allowed 3 h for diffusion at room temperature. After application of the sample, the gradient was centrifuged for 16 h at 20,000 rpm. Fractions (2 ml) were collected and used to measure the sucrose and protein content and the activity of the marker enzymes.

**Plasma membrane purification and Western blotting.** The plasma membrane was purified by application of the crude membrane fraction, obtained from 1.0 g (dry weight) of yeast, to a discontinuous sucrose gradient. The gradient was prepared by layering 0.8 ml of 53.5% (wt/vol) and 1.6 ml of 43.5% (wt/vol) sucrose in a tube of the SW60 rotor (Beckman). After centrifugation for 3 h at 55,000 rpm, the pellet and the two bands appeared, respectively, at the water/43.5% sucrose and the 43.5%/53.5% sucrose interphases and were diluted with 3 volumes of cold water. After centrifugation for 30 min at 40,000 rpm in a 50Ti rotor (Beckman), the pellets were suspended in 1.5 ml of 20% glycerol–10 mM Tricine-Tris (pH 7.5)–0.1 mM EDTA, 0.1 mM dithiothreitol and 1 mM PMSF. The maltose transporter and the plasma membrane ATPase were detected in

\* Corresponding author. Mailing address: Instituto de Investigaciones Biomédicas, CSIC, Arturo Duperier 4, 28029-Madrid, Spain. Phone: 34-1-5854614. Fax: 34-1-5854587. E-mail: RLagunas@biomed.ub.uam.es.

samples of these suspensions that were resolved, by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis SDS-PAGE (10 and 8% polyacrylamide, respectively) (22), with antiserum against the maltose transporter or against ATPase diluted 1/3,000 and 1/15,000, respectively, and goat anti-rabbit peroxidase conjugate diluted 1/10,000 in blocking buffer as the primary and secondary antibodies.

**Effect of alcohols on inactivation of the maltose and galactose transporters.** Cells were harvested during exponential growth with maltose or galactose (about 0.7 mg [dry weight]/ml), washed, and suspended in 3 volumes of an ammonium-free medium as described previously (2), with 2% glucose and 250  $\mu$ g of tetracycline hydrochloride per ml to avoid bacterial contamination and in the absence or presence of alcohols at the indicated concentrations. After incubation at 30°C in a rotatory shaker (200 rpm) for the indicated times, inactivation was monitored by measuring the activity of the transporters by using their labeled substrates (4, 28). The cells were harvested, washed, and suspended to a cellular density of 40 mg (dry weight) of yeast/ml in 0.1 M tartaric acid adjusted to pH 4.2 with Tris in the case of the maltose transporter or 50 mM  $K_2HPO_4$  (pH 6.0) in the case of the galactose transporter. Aliquots of 50  $\mu$ l, containing 2 mg (dry weight) of yeast, were added to 5  $\mu$ l of 45 mM labeled maltose or galactose (0.5  $\mu$ Ci/ $\mu$ mol), respectively, and incubated at 20°C for 15 s. Sugar uptake was stopped by the addition of 10 ml of chilled water. After rapid filtration, the cells and filters were washed with 10 ml of chilled water and immediately submerged in liquid scintillation cocktail, and the radioactivity was counted.

**Effect of ethanol on inactivation of the general amino acid permease.** Samples (15 ml) of cell cultures growing exponentially on minimal proline medium (10) (about 0.15 mg [dry weight]/ml) were put into prewarmed vessels containing 0.15 ml of 1 M  $(NH_4)_2SO_4$  and ethanol as required for the indicated final concentrations. After incubation for the indicated times at 30°C, L-citrulline uptake was measured essentially as previously described (10). Samples (1 ml) of cells were placed into prewarmed rotating flasks containing 10  $\mu$ l of 10 mM L-[U- $^{14}C$ ]citrulline (2  $\mu$ Ci/ $\mu$ mol). After incubation at 30°C for 1 min, citrulline uptake was stopped by the addition of 10 ml of chilled water. After rapid filtration, the cells and the filter were washed with 10 ml of chilled water and the radioactivity was counted.

**Effect of ethanol on  $H^+$ -ATPase activity.** Cells growing exponentially with maltose were harvested, washed, and suspended in 4% glucose to a cellular density of about 4 mg (dry weight)/ml. After incubation for 10 min at 30°C, the cells were rapidly harvested by filtration, frozen in liquid nitrogen, and stored at -70°C until analyzed. This treatment with glucose was performed to activate the  $H^+$ -ATPase (35). Aliquots of crude membrane preparations, corresponding to 5 to 50 mU of ATPase, were added to the assay buffer, as described previously (37), in the absence or in the presence of the indicated concentrations of ethanol. After incubation at 30°C for 10 min, the reaction was started by the addition of 2 mM ATP.

**Effect of ethanol on the activity of the sugar transporters.** Cells growing exponentially on galactose, glucose, or maltose were harvested, washed, and suspended to a cellular density of 40 mg (dry weight) of yeast/ml in 50 mM  $K_2HPO_4$  (pH 6.0) for glucose and galactose transport measurements or in 0.1 M tartaric acid, adjusted to pH 4.2 with Tris, for maltose transport measurements, in the absence or presence of ethanol at the indicated concentrations. Aliquots of 50  $\mu$ l, containing 2 mg (dry weight) of yeast, were added to 5  $\mu$ l of 45 mM labeled galactose, glucose, or maltose (0.5  $\mu$ Ci/ $\mu$ mol). After incubation for 15 s at 20°C, sugar uptake was stopped by the addition of 10 ml of chilled water. After rapid filtration, the cells and the filters were washed with 10 ml of chilled water and the radioactivity was counted.

**Effect of ethanol on fermentation.** Fermentation was measured manometrically at 30°C by a conventional method (43). Samples (1.5 ml) of cells, containing about 0.3 mg (dry weight) suspended in the inactivation medium with 2% glucose in the absence and presence of ethanol at the indicated concentrations, were placed in Warburg vessels and incubated at 30°C.  $CO_2$  formation was monitored for 4 h.

**Effect of ethanol on the cellular content of ATP.** Cells were harvested during exponential growth on maltose, washed and suspended in the inactivation medium in the absence or presence of ethanol at the indicated concentrations, and incubated at 30°C for 30, 90, and 180 min. Samples were taken by the rapid cellular sampling method described previously (32), without washing the cells with methanol-water at -40°C. ATP was measured enzymatically with phosphoglycerate kinase as described previously (15).

**Marker enzyme measurement.** NADPH-cytochrome *c* reductase, the marker enzyme of the endoplasmic reticulum, was measured as described in reference 34 with some modifications. The reaction mixture consisted of 50 mM potassium phosphate (pH 7.5), 0.5 mM KCN, 1  $\mu$ M flavin mononucleotide, 0.1% Triton X-100, 70  $\mu$ M cytochrome *c*, and 0.1 mM NADPH. Cytochrome *c* oxidase, the marker enzyme of the mitochondrial membrane, was measured as described in reference 44, except that the assay temperature was 30°C. Plasma membrane ATPase was determined as described in reference 37, and vacuolar ATPase was determined as described in reference 42.

**Protein and sucrose measurement.** Protein was determined by the method of Lowry et al. (21) after precipitation with trichloroacetic acid. Sucrose was measured with a refractometer.

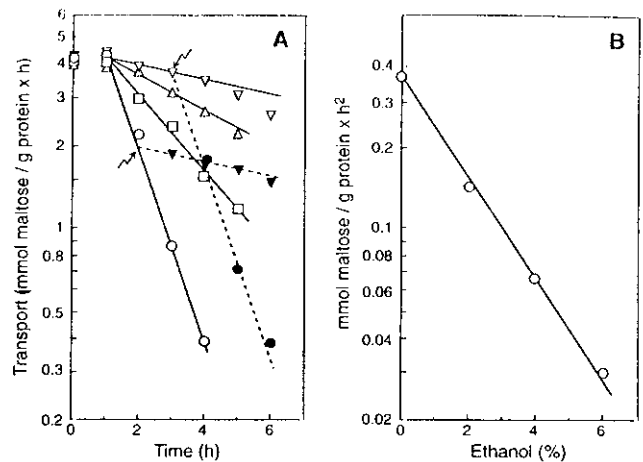


FIG. 1. Effect of ethanol in the rate of catabolite inactivation of the maltose transporter. (A) Strain WCG4a, transformed with plasmid pRM1-1 carrying the *MAL1* locus, was harvested during exponential growth with maltose, washed and suspended in the inactivation medium in the absence (O) or in the presence of 2 (□), 4 (△), or 6% (▽) ethanol, and incubated at 30°C. Where indicated by an arrow, 6% ethanol was added to the cell suspension (▼). Also where indicated by an arrow, cells were harvested, washed and suspended in fresh medium in the absence of ethanol (●). At the indicated times, the cells were harvested and assayed for maltose transport activity. (B) Semilogarithmic plot of the slopes of the straight lines shown in panel A against ethanol concentration.

## RESULTS

**Effect of ethanol on the rate of inactivation of the maltose transporter.** Inactivation of the transporter started after about 1 h of suspension of cells in the inactivation medium and followed first-order kinetics suggesting a half-life for the transporter of about 1 h (Fig. 1A). These results are in accordance with previous findings (28). In the presence of ethanol, lower rates of inactivation of the maltose transporter were observed depending on the concentration of ethanol. In the presence of 2, 4, and 6% ethanol, half-lives for the transporter of about 2.5, 5, and >10 h, respectively, could be calculated from the data in Fig. 1A. These results show that ethanol inhibits the catabolite inactivation of the maltose transporter. They also show that the inhibition starts immediately after the addition of ethanol (Fig. 1A) and is reversible, since yeast cells incubated for 3 h in the presence of 6% ethanol showed a normal rate of inactivation when ethanol was removed from the medium (Fig. 1A). When the slopes of the straight lines shown in Fig. 1A were plotted on a semilogarithmic scale against ethanol concentration, a straight line was obtained (Fig. 1B). This mathematical relationship between the two parameters is probably related to the action mechanism of ethanol. The fact that an inhibition like the one shown in Fig. 1 was also observed with two other strains, 5DBY 1869 and ATCC 42407 (results not shown), suggests that sensitivity to ethanol is a general feature of the maltose transport inactivation in yeast cells.

**Ethanol inhibits endocytosis of the transporter.** The results shown above suggest that ethanol inhibits internalization of the transporter, i.e., the first step of degradation of this protein, which remains active in the plasma membrane. We checked this possibility by investigating the location of the maltose transporter. To establish the conditions for purification of plasma membrane, a crude membrane preparation was applied to a continuous sucrose gradient and centrifuged as described in Materials and Methods. The distribution of marker enzymes through the gradient indicated that in ethanol-treated cells (Fig. 2), as well as in untreated cells (results not shown),

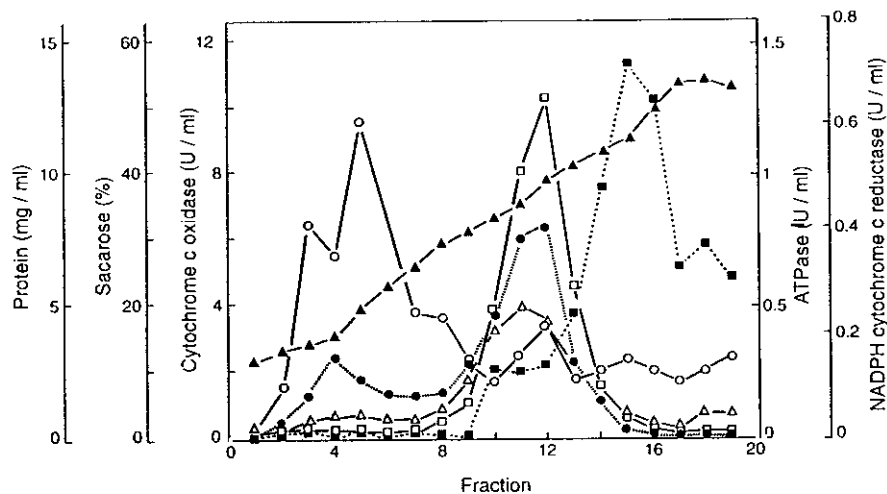


FIG. 2. Subcellular fractionation in a continuous sucrose gradient. Strain WCG4a, transformed with plasmid pRM1-1 carrying the *MAL1* locus, was harvested during exponential growth with maltose and washed and suspended in the inactivation medium in the presence of 6% ethanol. After incubation of cells at 30°C for 3 h, the crude membrane fraction was obtained, applied to the continuous sucrose gradient, and centrifuged as described in Materials and Methods. Fractions were collected and used to measure the sucrose (▲) and protein (●) contents and the activity of the marker enzymes: NADPH cytochrome c reductase (○), cytochrome c oxidase (□), vacuolar ATPase (△), and plasma membrane ATPase (■).

plasma membrane appeared, with very little contamination by other cellular membranes, in the gradient fractions containing 43.5 through 53.5% (wt/vol) sucrose. Based on these results, plasma membrane purification was performed with a discontinuous sucrose gradient of 43.5 and 53.5% (wt/vol). Immunoblots with anti-plasma membrane ATPase antibodies showed that, consistent with previous findings (35), the plasma membrane accumulated mainly at the 43.5/53.5% sucrose interphase of the gradient (Fig. 3A). In this fraction, there was little contamination by other cellular membranes, as indicated by the low activity of the corresponding marker enzymes (results not shown).

When we investigated the cellular location of the maltose transporter by immunoblotting it with antibodies against the transporter, we found that in growing cells, i.e., cells incubated for 0 h in the inactivation medium, the transporter was present, as expected, at the plasma membrane (Fig. 3B). This was indicated by the cofractionation of the maltose transporter with the plasma membrane ATPase (Fig. 3). We also found that in the absence of ethanol, the transporter disappeared after 5 h of incubation under inactivating conditions (Fig. 3B), confirming previous findings on the degradation of the transporter (22, 28). However, in the presence of 6% ethanol, the maltose transporter remained undegraded at the plasma membrane after 5 h of incubation (Fig. 3B). These results demonstrate that ethanol inhibits internalization of the maltose transporter by endocytosis. In accordance with the known stability of the plasma membrane ATPase (1), this enzyme remained undegraded at the plasma membrane under all conditions studied (Fig. 3A).

**Ethanol inhibits the inactivation of other plasma membrane proteins.** In addition to the maltose transporter, a number of plasma membrane proteins are inactivated under different physiological conditions by degradation in the vacuole after internalization by endocytosis (5, 6, 10, 13, 16, 29). To establish if ethanol also inhibits endocytosis of these proteins, we investigated the behavior of two of them, the galactose transporter and the general amino acid permease. As in the case of the maltose transporter, nitrogen starvation triggers inactivation of the galactose transporter (4), while the presence of a good

nitrogen source, such as  $\text{NH}_4^+$ , inactivates the general amino acid permease (7, 10). As shown in Fig. 4, we found that inactivation of these two proteins was also inhibited by ethanol, indicating that the effect of ethanol is not specific for the maltose transporter. In the case of the general amino acid permease, an increase in the activity was observed immediately after the beginning of the inactivation treatment (Fig. 4B). Control experiments showed that the activity of this protein is reversibly lost in the handling of the cells in the inactivation treatment (results not shown). This observation is in accordance with the reported high susceptibility of this protein to environmental changes (8).

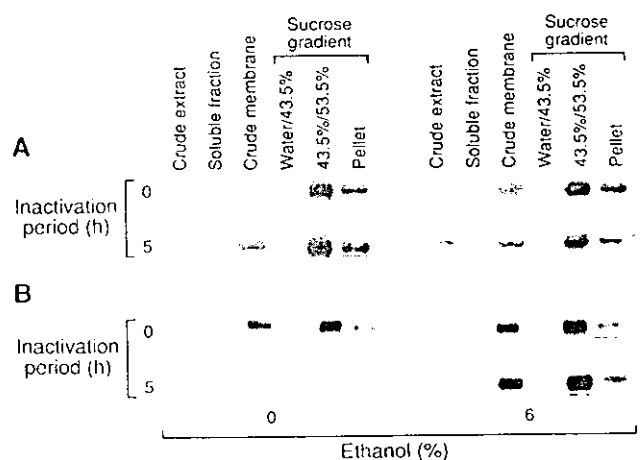


FIG. 3. Inhibition by ethanol of the internalization of the transporter. Strain WCG4a, transformed with plasmid pRM1-1 carrying the *MAL1* locus, was harvested during exponential growth with maltose and washed and suspended in the inactivation medium in the absence or presence of 6% ethanol as indicated. After incubation at 30°C for 0 or 5 h as indicated, the plasma membrane ATPase (A) and the maltose transporter (B) were analyzed in the different cellular fractions obtained as described in Materials and Methods with polyclonal antibodies.

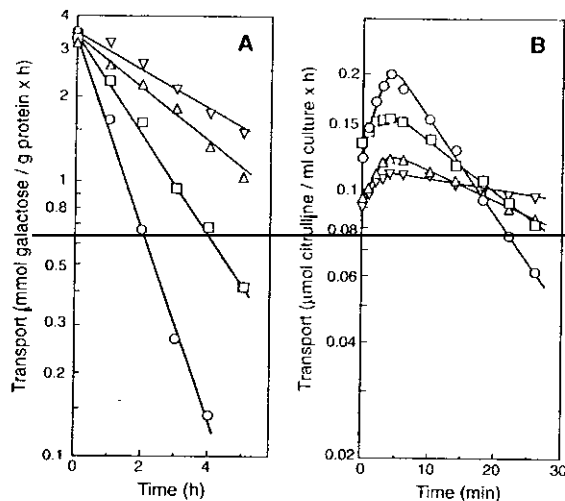


FIG. 4. Inhibition by ethanol of the inactivation of the galactose transporter and the general amino acid permease. (A) Strain ATCC 42407 was harvested during exponential growth on galactose and washed and suspended in the inactivation medium in the absence (○) or in the presence of 2% (□), 4% (△), or 6% (▽) ethanol. After incubation for the indicated times, galactose transport was measured. (B) Strain 23346c was harvested during exponential growth and suspended in the presence of 10 mM  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  and in the absence (○) or in the presence of 2% (□), 4% (△), or 6% (▽) ethanol (final concentration) as described in Materials and Methods. After incubation at 30°C for the indicated times, citrulline transport was measured.

**Mechanism of the inhibition.** Catabolite inactivation of sugar transporters requires energy and utilization of a fermentable substrate (2, 22, 24). Therefore, one possibility is that ethanol inhibits the endocytosis of the transporters by decreasing the rate of fermentation and/or the levels of ATP. We investigated this possibility and found that there is no apparent correlation between these parameters and the inhibition of endocytosis. As shown in Table 1, the effect of ethanol on the internalization rate of the maltose transporter was substantially greater than on fermentation or the ATP level at all concentrations of ethanol tested. Particularly relevant is the fact that a normal rate of fermentation and ATP level were detected in the presence of 2% ethanol, when the internalization rate of the transporter was inhibited by more than 60%

TABLE 1. Effect of ethanol on fermentation rate and ATP levels<sup>a</sup>

Ethanol concn (%)	Ethanol-mediated inhibition (%) of:		
	Internalization rate <sup>b</sup>	Fermentation rate <sup>c</sup>	ATP level <sup>d</sup>
0	0	0	0
2	65	2	3
4	86	19	17
6	95	39	22

<sup>a</sup> Strain WCG4a transformed with plasmid pRM1-1 carrying the *MAL1* locus was harvested during exponential growth with maltose, washed and suspended in the inactivation medium in absence or in the presence of ethanol at the indicated concentrations, and incubated at 30°C. Data are mean values for two experiments. Differences between the two values were <10%.

<sup>b</sup> Inhibition of the internalization rate of the transporter was calculated from the slopes of the straight lines of Fig. 1A.

<sup>c</sup> The fermentation rate of glucose in the absence of ethanol was 17.5 mmol/g of protein-h.

<sup>d</sup> Samples to determine the cellular content of ATP were obtained after 30, 90, and 180 min of incubation. Similar results were obtained for the three incubation periods. The ATP level in the absence of ethanol was 1.52 μM. For the calculations, an intracellular volume of 2.4 μl/mg (dry weight) of yeast has been assumed (20).

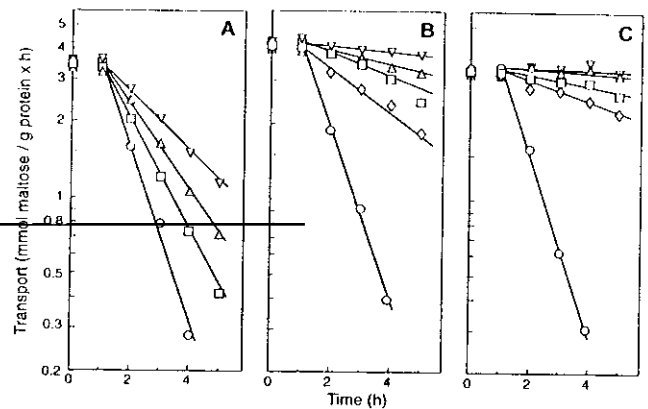


FIG. 5. Effect of methanol, isopropanol, and *n*-propanol in the rate of catabolite inactivation. Strain WCG4a, transformed with plasmid pRM1-1 carrying the *MAL1* locus, was harvested during exponential growth with maltose and treated as in Fig. 1A in the absence (○) or in the presence of 1% (◇), 2% (□), 4% (△), or 6% (▽) methanol (A), isopropanol (B), or *n*-propanol (C). At the indicated times, the cells were harvested and assayed for maltose transport activity.

(Table 1). It seems, therefore, that the effect of ethanol is not due to the inhibition of catabolism.

Ethanol, like other alcohols, alters the organization of the lipid bilayer of the biological membranes, giving rise to an increase in the molecular movement within these structures (membrane fluidity). These alterations result from a complex combination of physical effects both directly on the membrane and on the membrane environment, which depend on the lipid-buffer partition coefficient of alcohols (for reviews, see references 14 and 39). Therefore, another possibility is that ethanol inhibits internalization of the transporters through alterations produced in the organization of the plasma membrane. If this were the case, two predictions could be made: (i) the inhibition would not be ethanol specific but would also be produced by other alcohols, and (ii) the inhibition produced by alcohols would increase with their lipid-buffer partition coefficient (14).

The results obtained met these two predictions, since we found that other alcohols, like methanol, isopropanol, and *n*-propanol (Fig. 5), inhibited internalization of the maltose transporter and also that the inhibitory effect of the tested alcohols increased in the following order: methanol < ethanol < isopropanol < *n*-propanol (Fig. 1 and 5). These facts strongly indicate that ethanol inhibits endocytosis of the transporter through its effect on the structure of the plasma membrane.

**Endocytosis is particularly sensitive to the action of ethanol.** Specific functions of the plasma membrane are accomplished by a variety of proteins, whose efficiency may depend upon the lipid bilayer organization. Many of these proteins are implicated in transport processes. To establish if other functions of plasma membrane are affected by ethanol to a similar extent to that of endocytosis, we have investigated the effect of ethanol on the activity of proteins which play important catabolic roles and which are among the most abundant in the yeast plasma membrane (38): the  $\text{H}^+$ -ATPase, which is responsible for the extrusion of protons produced in catabolism or passively diffused into the cells from the medium (9, 36), and the sugar transport systems of glucose, galactose, and maltose, which catalyze the first step of glycolysis and limit the rate of fermentation (19). The results obtained show that at all concentrations of ethanol tested, the internalization rate of the maltose

TABLE 2. Effect of ethanol on H<sup>+</sup>-ATPase activity and rate of sugar uptake<sup>a</sup>

Ethanol concn (%)	Ethanol-mediated inhibition (%) of:			
	ATPase activity <sup>b</sup>	Uptake <sup>c</sup> of:		
		Galactose	Glucose	Maltose
0	0	0	0	0
2	<5	7	21	6
4	<5	25	29	25
6	<5	35	36	55

<sup>a</sup> Strain WCG4a transformed with plasmid pRMI-1 carrying the *MAL1* locus was harvested during exponential growth with maltose or galactose (for galactose uptake measurements). In the case of H<sup>+</sup>-ATPase, the cells were harvested, washed and suspended under the inactivation conditions in the absence or presence of ethanol at the indicated concentrations, and incubated at 30°C. Data are mean values for two experiments. Differences between the two values were <12%.

<sup>b</sup> The ATPase activity in the absence of ethanol was 1.5 U/mg of protein.

<sup>c</sup> The uptake of galactose, glucose, and maltose in the absence of ethanol was, respectively, 4.7, 10.4, and 8.2 mmol of hexose/g of protein/h.

transporter by endocytosis was more strongly inhibited than the activity of the proteins investigated (Table 2). These results indicate that endocytosis is particularly sensitive to ethanol compared with other processes occurring at the plasma membrane. The observed tolerance to ethanol of plasma membrane processes other than endocytosis is in accordance with previous findings indicating that among eukaryotes, *Saccharomyces* spp. appear to be the most alcohol-resistant organism (14).

## DISCUSSION

Endocytosis is a very complex process by which macromolecules, solutes, and plasma membrane proteins are internalized into vesicles which invaginate from the plasma membrane. In the case of the yeast maltose transporter, endocytosis is triggered by starvation for a nitrogen source and requires the action of at least two enzymes of the ubiquitin pathway (23), microfilaments of actin and actin-binding proteins (27), and clathrin-coated structures (23a). Some of these proteins, like the two enzymes of the ubiquitin pathway (23) and clathrin-coated structures (30), might be implicated in signaling and concentration of the transporter in specific portions of the plasma membrane, while others, like microfilaments, might play a dynamic role in the invagination (17). Ethanol, through its effect in the lipid bilayer organization, could affect several of these proteins, resulting in a strong effect in the action of the whole endocytic machinery. This would explain the great sensitivity toward ethanol of maltose transporter endocytosis compared with other functions that also occur at the plasma membrane but depend on the action of a single protein. The fact that inactivation of the galactose transporter and the general amino acid permease, which also requires endocytosis, is also sensitive to ethanol suggests that sensitivity to ethanol is a general feature of endocytosis. This conclusion seems quite logical, since the requirements for endocytosis in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* appears to be greatly conserved (5, 6, 10, 12, 13, 16, 17, 40). Interestingly, it has been shown that long-term administration of ethanol to animals markedly impairs endocytosis of a number of plasma membrane receptors in hepatocytes (3, 41).

Sugars are the most important carbon and energy source for yeast cells, and ethanol is the major product of sugar catabolism in this organism. As a consequence, under laboratory and industrial conditions as well as in natural habitats, yeast cells may be in the presence of ethanol at concentrations in which

endocytosis is inhibited. This fact rises the question of the physiological relevance of endocytosis. One possibility is that endocytosis and hence internalization of plasma membrane proteins are normally negligible and therefore the presence or the absence of the inhibitor is irrelevant. In this case, endocytosis of sugar transporters would become significant only under artificial conditions, i.e., after transfer of the cells to a fresh medium without a nitrogen source and with a fermentable substrate. However, catabolite inactivation of sugar transporters appears to be more than a curiosity, since it has been reported during enological fermentations (33). Since ethanol is present at high concentrations in such fermentations, yeast cells might have developed some device to circumvent the inhibition of endocytosis by ethanol. This possibility will be investigated.

## ACKNOWLEDGMENTS

We are very grateful to M. Herweijer and R. Serrano for the gift of the polyclonal antibodies against the maltose transporter and the plasma membrane ATPase, to A. Fernández and J. Pérez for help in the preparation of the figures, and to C. Gancedo and J. M. Gancedo for critical reading of the manuscript.

This work was supported by the Spanish Dirección General Científica y Técnica (PB 94-0091-CO2-01) and by the European Commission (BIO4-CT95-01).

## REFERENCES

- Benito, B., E. Moreno, and R. Lagunas. 1991. Half-life of the plasma membrane ATPase and its inactivating system in resting yeast cells. *Biochim. Biophys. Acta* 1063:265-268.
- Busturia, A., and R. Lagunas. 1985. Identification of two forms of the maltose transport system in *Saccharomyces cerevisiae* and their regulation by catabolite inactivation. *Biochim. Biophys. Acta* 820:324-326.
- Casey, C. A., S. L. Kragosk, M. F. Sorrell, and D. J. Tuma. 1987. Chronic ethanol administration impairs the binding and endocytosis of asialoorosomucoid in isolated hepatocytes. *J. Biol. Chem.* 262:2704-2710.
- DeJuan, C., and R. Lagunas. 1986. Inactivation of the galactose transport system in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* 207:258-261.
- Egner, E., and K. Kuchler. 1996. The yeast multidrug transporter Pdr5 of the plasma membrane is ubiquitinated prior to endocytosis and degradation in the vacuole. *FEBS Lett.* 378:177-181.
- Galan, J. M., V. Moreau, B. André, C. Volland, and R. Haguenaer-Tsapis. 1996. Ubiquitination mediated by the Npi1p/Rsp5p ubiquitin-protein ligase is required for endocytosis of the yeast uracil permease. *J. Biol. Chem.* 271:10946-10952.
- Grenson, M. 1983. Inactivation-reativation process and repression of permease formation regulate several ammonia sensitive permeases in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur. J. Biochem.* 133:135-139.
- Grenson, M., M. Mousset, J. M. Wiame, and J. Béchet. 1966. Multiplicity of the amino acid permease in *Saccharomyces cerevisiae*. Evidence for a specific arginine-transporting system. *Biochim. Biophys. Acta* 127:325-338.
- Goffeau, A. 1988. The H<sup>+</sup>-ATPase from yeast plasma membrane. A survey of recent progress. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 21:1233-1240.
- Hein, C., J. V. Springael, C. Volland, R. Haguenaer-Tsapis, and B. André. 1995. *NPI1*, an essential yeast gene involved in induced degradation of Gap1 and Fur4 permeases, encodes the Rsp5 ubiquitin-protein ligase. *Mol. Microbiol.* 18:77-87.
- Heinemeyer, W., A. Grubler, V. Mohrle, Y. Mahé, and D. H. Wolf. 1993. *PRE2*, highly homologous to the human major histocompatibility complex-linked *RING10* gene, codes for a yeast proteasome subunit necessary for chymotryptic activity and degradation of ubiquitinated proteins. *J. Biol. Chem.* 268:5115-5120.
- Hicke, L., and H. Riezman. 1996. Ubiquitination of a yeast plasma membrane receptor signals its ligand-stimulated endocytosis. *Cell* 84:277-287.
- Horak, J., and D. H. Wolf. 1997. Catabolite inactivation of the galactose transporter in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: ubiquitination, endocytosis and degradation in the vacuole. *J. Bacteriol.* 179:1541-1549.
- Ingram, L. O., and T. M. Buttke. 1984. Effects of alcohols on microorganisms. *Adv. Microb. Physiol.* 25:253-300.
- Jaworek, D., and J. Welsch. 1985. Adenosine 5'-triphosphate. UV-method with phosphoglycerate kinase, p. 340-346. In H. U. Bergmeyer, J. Bergmeyer, and M. Graef (ed.), *Methods of enzymatic analysis*, 3rd ed. VCH, Weinheim, Germany.
- Kölling, R., and C. Hollenberg. 1994. The ABC-transporter Ste6 accumulates in the plasma membrane in a ubiquitinated form in endocytosis mutants. *EMBO J.* 13:3261-3271.

17. Kubler, E., and H. Riezman. 1993. Actin and fimbrin are required for the internalization step of endocytosis in yeast. *EMBO J.* **12**:2855-2862.
18. Lagunas, R. 1986. Misconceptions about the energy metabolism of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **2**:221-228.
19. Lagunas, R., C. Domínguez, A. Busturia, and M. J. Sáez. 1982. Mechanism of appearance of the Pasteur effect in *Saccharomyces cerevisiae*: Inactivation of sugar transport systems. *J. Bacteriol.* **152**:19-25.
20. Lagunas, R., and E. Moreno. 1985. The calculation of cellular parameters from the turbidity of yeast cultures may give rise to important errors. *FEMS Microbiol. Lett.* **29**:335-337.
21. Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr, and R. J. Randall. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**:265-275.
22. Lucero, P., M. Herweijer, and R. Lagunas. 1993. Catabolite inactivation of the yeast maltose transporter is due to proteolysis. *FEBS Lett.* **333**:165-169.
23. Lucero, P., and R. Lagunas. 1997. Catabolite inactivation of the yeast maltose transporter requires ubiquitin-ligase Npi1/Rsp5 and ubiquitin-hydrolase Npi2/Doa4. *FEMS Microbiol. Lett.* **147**:273-277.
- 23a. Lucero, P., and R. Lagunas. Unpublished data.
24. Medintz, I., H. Jiang, E. K. Han, W. Cul, and C. A. Michels. 1996. Characterization of the glucose induced inactivation of the maltose permease in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* **178**:2245-2254.
25. Novick, P., and D. Botstein. 1985. Phenotypic analysis of temperature-sensitive actin mutants. *Cell* **40**:405-416.
26. Ohmori, H., S. Toyama, and S. Toyama. 1992. Direct proof that the primary site of action of cytochalasin D of cell motility is actin. *J. Cell Biol.* **116**:933-941.
27. Peñalver, E., L. Ojeda, E. Moreno, and R. Lagunas. 1997. Role of the cytoskeleton in endocytosis of the yeast maltose transporter. *Yeast* **13**:541-549.
28. Riballo, E., M. Herweijer, D. H. Wolf, and R. Lagunas. 1995. Catabolite inactivation of the yeast maltose transporter occurs in the vacuole after internalization by endocytosis. *J. Bacteriol.* **177**:5622-5627.
29. Riballo, E., and R. Lagunas. 1994. Involvement of endocytosis in catabolite inactivation of the K<sup>+</sup> and glucose transport systems in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol. Lett.* **121**:77-80.
30. Robinson, M. S. 1994. The role of clathrin, adaptors and dynamin in endocytosis. *Curr. Opin. Cell Biol.* **6**:538-544.
31. Rodicio, R. 1986. Insertion of non-homologous DNA sequences into regulatory gene cause constitutive maltase synthesis in yeast. *Curr. Genet.* **11**:235-241.
32. Sáez, M. J., and R. Lagunas. 1976. Determination of intermediary metabolites in yeast. Critical examination of the effect of sampling conditions and recommendations for obtaining true levels. *Mol. Cell. Biochem.* **13**:73-78.
33. Salmon, J. M., and O. Vincent. 1993. Sugar transport inactivation in *Saccharomyces cerevisiae* as a major limiting factor during enological fermentations. *Am. J. Enol. Vitic.* **44**:56-64.
34. Schatz, G., and J. Klima. 1964. Triphosphopyridine nucleotide-cytochrome c reductase of *Saccharomyces cerevisiae*: a microsomal enzyme. *Biochim. Biophys. Acta* **81**:448-461.
35. Serrano, R. 1983. In vivo glucose activation of the yeast plasma membrane ATPase. *FEBS Lett.* **156**:11-14.
36. Serrano, R. 1984. Plasma membrane ATPase of fungi and plants as a novel type of proton pump. *Curr. Top. Cell Regul.* **23**:87-124.
37. Serrano, R. 1988. H<sup>+</sup>-ATPase from plasma membrane of *Saccharomyces cerevisiae* and *Avena sativa* roots. Purification and reconstitution. *Methods Enzymol.* **157**:533-544.
38. Serrano, R. 1991. Transport across yeast vacuolar and plasma membranes, p. 553-585. In J. R. Pringle and E. V. Jones (ed.), *Molecular and cellular biology of the yeast Saccharomyces cerevisiae*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.
39. Slater, J. L., and C. H. Huang. 1992. Lipid bilayer interdigitation, p. 175-210. In P. Yeagle, (ed.), *Structure of biological membranes*. CRC Press, Inc., Boca Raton, Fla.
40. Tan, P. K., N. G. Davis, G. F. Sprague, and G. S. Payne. 1993. Clathrin facilitates the internalization of seven transmembrane segment receptors for mating pheromones in yeast. *J. Cell Biol.* **123**:1707-1716.
41. Tuma, D. J., S. L. Todero, M. Barak-Bernhagen, and M. F. Sorrel. 1996. Effects of chronic ethanol administration on endocytosis of cytokines by rat hepatocytes. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* **20**:579-583.
42. Uchida, E., O. Yoshinori, and Y. Anraku. 1988. Purification of yeast vacuolar membrane H<sup>+</sup>-ATPase and enzymological discrimination of three ATP-driven proton pumps in *Saccharomyces cerevisiae*. *Methods Enzymol.* **157**:544-562.
43. Umbreit, W. W., R. H. Burris, and J. F. Stauffer. 1957. *Manometric techniques*, 3rd ed. Burgess Publishing Co, Minneapolis, Minn.
44. Wharton, D. C., and A. Tzagoloff. 1967. Cytochrome c oxidase from beef heart mitochondria. *Methods Enzymol.* **10**:245-250.



# Clathrin and Two Components of the COPII Complex, Sec23p and Sec24p, Could Be Involved in Endocytosis of the *Saccharomyces cerevisiae* Maltose Transporter

ÉLIDA PEÑALVER, PILAR LUCERO, EULALIA MORENO, AND ROSARIO LAGUNAS\*

*Instituto de Investigaciones Biomédicas, CSIC, 28029-Madrid, Spain*

Received 19 November 1998/Accepted 10 February 1999

The *Saccharomyces cerevisiae* maltose transporter is a 12-transmembrane segment protein that under certain physiological conditions is degraded in the vacuole after internalization by endocytosis. Previous studies showed that endocytosis of this protein is dependent on the actin network, is independent of microtubules, and requires the binding of ubiquitin. In this work, we attempted to determine which coat proteins are involved in this endocytosis. Using mutants defective in the heavy chain of clathrin and in several subunits of the COPI and the COPII complexes, we found that clathrin, as well as two cytosolic subunits of COPII, Sec23p and Sec24p, could be involved in internalization of the yeast maltose transporter. The results also indicate that endocytosis of the maltose transporter and of the  $\alpha$ -factor receptor could have different requirements.

Vesicles are responsible for the traffic of proteins in the cells. Formation of vesicles requires the action of coat proteins which are recruited from the cytosol onto a particular membrane to drive budding and to select the vesicle cargo (for reviews, see references 31 and 49). In *Saccharomyces cerevisiae* cells, three types of vesicles which differ in their function and coat composition have been identified. Clathrin-coated vesicles, formed from the plasma membrane and trans-Golgi network, are involved in endocytosis as well as in the secretion of proteins (for a review, see reference 43). COPI (or coatamer) is a large cytosolic protein complex which forms a coat around vesicles budding from the Golgi apparatus and endoplasmic reticulum (ER) (3). Its role has been a subject of controversy, but accumulated data suggest that COPI is involved in both anterograde and retrograde transport in the ER-Golgi system (for reviews, see references 8 and 42). Some components of COPI might also play a role in early endocytosis in animal cells (1, 16, 49). COPII is another cytosolic complex which directs the budding of vesicles from the ER and is involved in the anterograde transport of proteins to Golgi (for a review, see reference 24). To our knowledge, evidence for a role of COPII in endocytosis has not been reported.

Solutes, receptors, and damaged or unneeded plasma membrane proteins are internalized by endocytic vesicles. Two markers are generally used to investigate endocytosis in *S. cerevisiae*: Lucifer yellow CH as a nonspecific marker of the fluid phase endocytosis by which bulk solutes are internalized; and  $\alpha$ - and  $\alpha$ -factors as specific markers of the receptor-mediated endocytosis by which specific solutes are internalized when bound to specific receptors on the cell surface (12, 47).  $\alpha$ - and  $\alpha$ -factors bind to their 7-transmembrane segment (7-TMS) receptors and are internalized and degraded in the vacuole (10). These 7-TMS receptors also show a constitutive endocytosis, which becomes apparent in the absence of the corresponding pheromone. In recent years, a number of plasma membrane proteins with 12-transmembrane segments (12-TMS) have been shown to follow endocytosis. Several transporters

which are internalized without binding of external ligand to be degraded in the vacuole belong to this group of proteins (13, 18, 23, 26, 30, 35, 36, 48). Among these transporters, the maltose transporter seems well suited as an endocytic marker of the 12-TMS proteins since it is quite abundant in yeast cells, shows a biochemical activity that can be easily measured, and is well characterized both biochemically (for a review, see reference 25) and genetically (7). Previous studies showed that endocytosis of the maltose transporter is partially dependent on the actin network, is independent of microtubules (32), and requires binding of ubiquitin, probably as a signal for endocytosis (28). We attempt here to establish which of the coat proteins is involved in endocytosis of this transporter. We investigated two steps of endocytosis as follows. Internalization was investigated by measuring the decrease in transport activity with radioactive maltose as well as the disappearance of the transporter from the plasma membrane with antibodies. Degradation was investigated by following the cellular content of the transporter with antibodies. Using strains deficient in the clathrin heavy chain, in the  $\alpha$ -,  $\beta$ -, and  $\gamma$ -COPI subunits, or in the COPII components Sec23p, Sec24p, Sec13p, Sec31p, and Sec16p, we conclude that clathrin and two components of COPII, Sec23p and Sec24p, might play a role in the internalization of the maltose transporter.

## MATERIALS AND METHODS

Reagents,  $n$ -[U- $^{14}$ C]maltose and enhanced chemiluminescence reagents were from Amersham International (Little Chalfont, United Kingdom). Goat anti-rabbit antibody-peroxidase conjugate was from Biosource International (Camarillo, Calif.). All other reagents were of analytical grade.

**Yeast strains and growth conditions.** The genotypes of the strains are described in Table 1. All these strains were unable to grow on maltose and were transformed with the multicopy plasmid pRM1-1, which carries the *MAL1* locus (39). The transformed cells, which grew and transported maltose at rates the same as those of *mal*<sup>+</sup> wild-type strains, were grown at 24°C in a rotary shaker (200 rpm) in a medium containing 2% peptone, 1% yeast extract, 2% maltose, and 3 ppm of antimycin A to force utilization of maltose. Cell growth was monitored by measuring optical densities at 640 nm.

**Conditions for endocytosis of the maltose transporter and of the  $\alpha$ -factor receptor.** Cells were harvested during exponential growth (about 0.7 mg [dry weight] per ml), washed, and suspended in 3 volumes of an ammonium-free medium as described previously (6) in the presence of 2% glucose and 250  $\mu$ g of tetracycline chlorohydrate per ml to avoid bacterial contamination. The suspension was incubated at 24, 32, or 35°C in a rotary shaker (200 rpm). Samples of the suspensions were taken at various times, and endocytosis of the maltose transporter and of the  $\alpha$ -factor receptor was measured.

\* Corresponding author. Mailing address: Instituto de Investigaciones Biomédicas, CSIC, Arturo Duperier, 4, 28029-Madrid, Spain. Phone: 34-91-5854614. Fax: 34-91-5854587. E-mail: R.lagunas@iib.uam.es.

TABLE 1. Strains used in this work

<i>S. cerevisiae</i> strain (reference)	Genotype
GPY1100 (47)	<i>MAT<math>\alpha</math> leu2-3,112 ura3-52 his4-519 trp1 can1</i>
GPY418 (47)	<i>MAT<math>\alpha</math> leu2-3,112 ura3-52 his4-519 trp1 can1 chc1-521</i>
RSY255 (21)	<i>MAT<math>\alpha</math> ura3,52 leu2-3,112</i>
RSY1196 (21)	<i>MAT<math>\alpha</math> ura3-52 leu2-3,112 sec24-1</i>
RSY617 (21)	<i>MAT<math>\alpha</math> ura3-52 leu2-3,112 sec16-1</i>
RSY277 (21)	<i>MAT<math>\alpha</math> ura3-52 sec21-1</i>
RSY281 (21)	<i>MAT<math>\alpha</math> ura3-52 his4-619 sec23-1</i>
RSY265 (21)	<i>MAT<math>\alpha</math> ura3-52 his4-619 sec13-1</i>
RSY952 (21)	<i>MAT<math>\alpha</math> ura3-52 leu2-3 sec31-1</i>
RH402-6B (26a)	<i>MAT<math>\alpha</math> ura3 leu2 his4 lys2 trp1 ret1-1</i>
RSY146 (11)	<i>MAT<math>\alpha</math> ura3-52 leu2-3 trp1 sec27-1</i>
RH448 (19)	<i>MAT<math>\alpha</math> ura3 leu2 his4 lys2 bar1-1</i>
RH1436 (19)	<i>MAT<math>\alpha</math> ura3 leu2 his4 sec23-1 bar1-1</i>

**Endocytosis of the maltose transporter.** To measure endocytosis of the maltose transporter, two steps were monitored, internalization and degradation. Internalization was measured by monitoring two parameters, the decrease in the rate of transport activity with radioactive maltose as previously described (35) and the disappearance of the transporter from the plasma membrane by immunoblotting purified plasma membrane preparations as previously described (29).

In the latter case, the  $H^+$ -ATPase was used as a marker protein of plasma membrane (45). Degradation of the maltose transporter was determined by immunoblotting crude extract preparations as previously described (29).

**Endocytosis of the  $\alpha$ -factor receptor.** Constitutive endocytosis of the  $\alpha$ -factor receptor was monitored by measuring its rate of internalization in the absence of the pheromone. To this end, the disappearance of the receptor from the plasma membrane was monitored by measuring the binding of labeled  $\alpha$ -factor by the procedure described in reference 40 with some modifications. Ten-milliliter aliquots of the yeast suspension in the ammonium-free medium (see above), containing about  $5 \times 10^7$  cells, were incubated for various time periods at 24 or 32°C. Next, 0.5 ml of 200 mM  $NaNO_3$  and 200 mM NaF, two inhibitors of the energy metabolism, was added to stop endocytosis. The cells were then harvested by centrifugation and suspended in 0.25 ml of the rich medium YPUAD previously described (51), in the presence of 10 mM  $NaNO_3$  and 10 mM NaF. To 0.1 ml of this suspension, a  $10^{-6}$  M final concentration of  $^{35}S$ -labeled  $\alpha$ -factor, obtained and purified as described previously (12), was added. After incubation for 30 min at 30°C, 2 ml of the YPUAD medium in the presence of the inhibitors was added, and the cells were harvested by filtration through GF/C glass fiber filters (2.5 cm diameter), washed with 2 ml of the same medium, and counted for their radioactivity. To subtract the radioactivity due to unspecific binding of the labeled  $\alpha$ -factor, controls were run in parallel. In this case, the cells were added to a  $10^{-6}$  M final concentration of  $^{35}S$ -labeled  $\alpha$ -factor plus  $4 \times 10^{-5}$  M unlabeled  $\alpha$ -factor.

**Crude extract preparation, plasma membrane purification, and immunoblotting.** Crude extract and crude membrane fraction were obtained as previously described (45). Plasma membrane purification was achieved by application of the crude membrane fraction to a discontinuous sucrose gradient as previously described (29). Samples of crude extract and purified plasma membrane prepa-

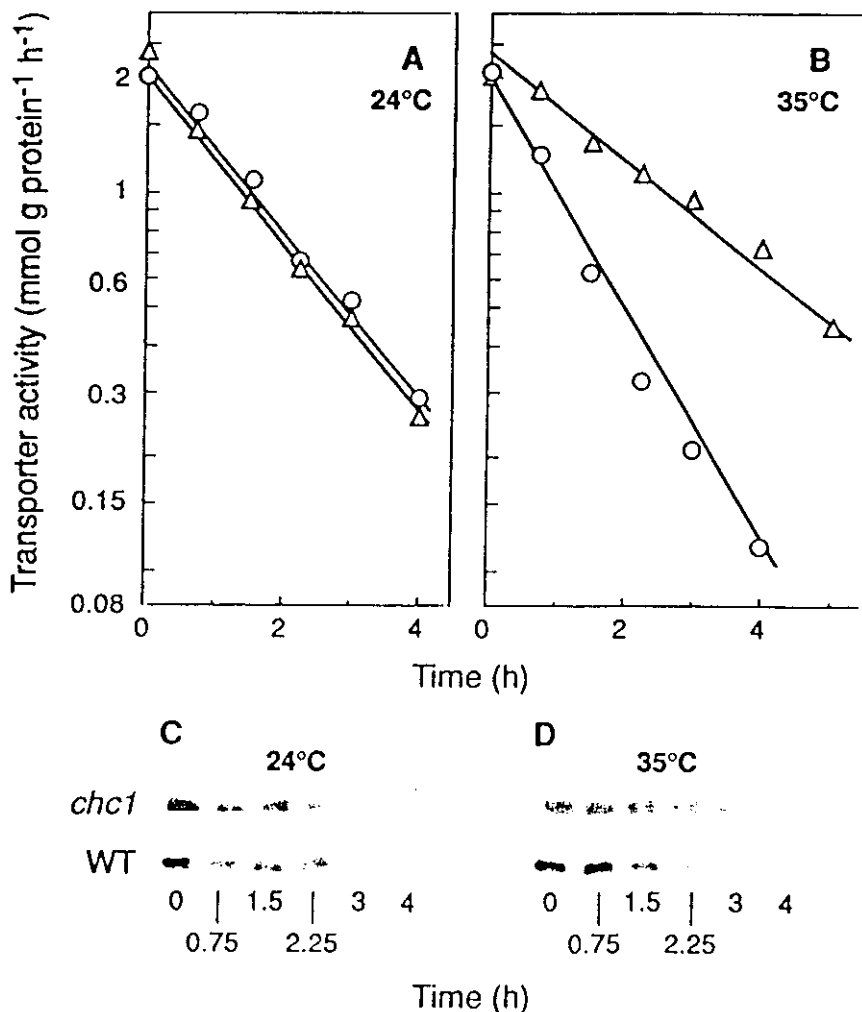


FIG. 1. Internalization and degradation of the maltose transporter in a mutant defective in clathrin. Strains GPY1100 (*CHC1*, wild type [WT]; ○) and GPY 418 (*chc1-1*; △), transformed with the plasmid pRM1-1 carrying the *MAL1* locus, were harvested during exponential growth at 24°C, washed, and suspended in 3 volumes of the endocytosis medium. After incubation at 24°C (A and C) or 35°C (B and D) for the indicated times, the cells were harvested and assayed for maltose transporter activity (A and B). The maltose transporter band was detected by immunoblotting aliquots, containing 40  $\mu$ g of protein of cellular extracts obtained at the indicated times (C and D).

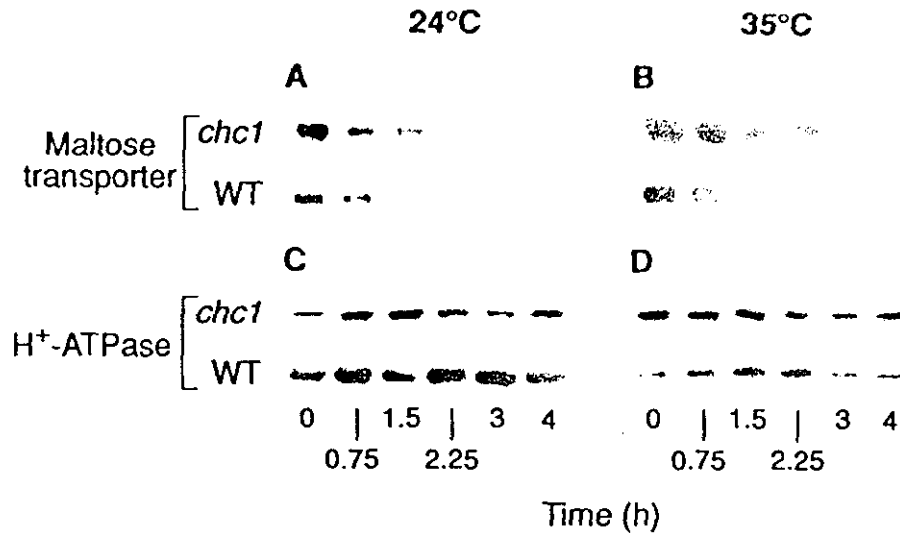


FIG. 2. Disappearance of the maltose transporter from the plasma membrane in a mutant defective in clathrin. Strains GPY1100 (*CHC1*, wild type [WT]) and GPY418 (*chc1-1*), transformed with the plasmid pRMI-1 carrying the *MAL1* locus, were grown and treated as described in the legend for Fig. 1. After incubation at 24°C (A and C) or 35°C (B and D) maltose transporter (A and B) and  $H^+$ -ATPase (C and D) were detected by immunoblotting aliquots containing 7 and 3  $\mu$ g of protein, respectively, of purified plasma membrane preparations obtained at the indicated times.

rations were resolved by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, and the maltose transporter and the  $H^+$ -ATPase were detected by enhanced chemiluminescence by using the polyclonal antibodies anti-maltose transporter and anti-ATPase as previously described (29).

**Protein measurements.** Protein was determined after precipitation with trichloroacetic acid by the method described previously (27).

## RESULTS

**Internalization and degradation of the maltose transporter in a clathrin-deficient mutant.** The clathrin coat consists of a basic building block, the triskelion, formed by three heavy chains and three light chains with different sizes (42), and of complexes of associated proteins, adaptors, which select cargo proteins by interacting with specific signals (43). A single gene, *CHC1*, codes for the clathrin heavy chain in *S. cerevisiae*, and a conditional mutant of this gene, *chc1-525*, which at the nonpermissive temperature of 35°C is immediately perturbed in clathrin secretory (44) and endocytic functions (47), has been isolated. We used this mutant, as well as its isogenic wild-type strain, to investigate if clathrin plays a role in endocytosis of the maltose transporter. Since the maltose transporter is internalized for proteolysis in the vacuole during nitrogen starvation in the presence of glucose (30, 33, 35), we triggered endocytosis of this protein by starving the cells of ammonium in the presence of this sugar. To monitor its internalization, we measured the decrease in transport activity (36) and found that, at 24°C, this activity decreased at a similar rate in mutant and wild-type cells (Fig. 1A) while, at 35°C, a reduction in this rate of about 50% was observed in the mutant compared with the wild-type cells (Fig. 1B). These results indicated that clathrin is required for a normal rate of internalization of the transporter. If this were the case, at 35°C, disappearance of the transporter from the plasma membrane and, consequently, degradation of this protein would occur at a lower rate in the mutant than in the wild-type cells, whereas at 24°C, differences between the two strains would not be observed.

To check these predictions, degradation (Fig. 1) and disappearance of the transporter from the plasma membrane (Fig. 2) were monitored by immunoblotting crude extracts and plasma membrane preparations, respectively. The results

showed that, in both cases, the intensity of the band corresponding to the transporter decreased at 35°C, at a lower rate in mutant cells than in wild-type cells (Fig. 1D and 2B) while at 24°C, no differences were observed (Fig. 1C and 2A). In the experiments with plasma membrane, the  $H^+$ -ATPase was used as a marker protein (45). It has been shown that under the conditions used in this work, the  $H^+$ -ATPase remains stable (4, 29) and, in accordance with this, we found that the intensity of the band corresponding to this protein remained constant (Fig. 2C and D).

These results indicate that clathrin-coated vesicles could play a role in internalization of the maltose transporter, accounting for about 50% of endocytosis of the transporter. This partial contribution of clathrin to endocytosis suggests that clathrin is not the sole mediator of plasma membrane vesiculation and that another protein(s) can perform the complementing function. The components of the two other known coat complexes, COPI and COPII, seem to be good candidates to provide this function.

**Internalization and degradation of the transporter in mutants deficient in COPI components.** COPI is a protein complex consisting of seven subunits,  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\beta'$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ , and  $\zeta$ , which are found in the cytosol and on the cytoplasmic side of the Golgi compartment and which are assembled to form coated vesicles by the action of the small GTP-binding protein ARF. Although the biochemical description of COPI and its association with membranes in vitro is very detailed, its precise role in living cells is not well defined. COPI-coated vesicles seem responsible for steps in both anterograde and retrograde transport in the ER-Golgi system (42) and certain subunits of COPI might play a role in endocytosis in animal cells (1, 16, 49).

In *S. cerevisiae*,  $\alpha$ -,  $\beta'$ -, and  $\gamma$ -COP are the products of the *RET1*, *SEC27*, and *SEC21* genes, respectively. Temperature-sensitive mutants in these genes have been isolated which, at the nonpermissive temperature of 35°C, show a severe defect in protein transport from the ER and accumulation of ER membranes (11, 15, 20, 46). We used these mutants, as well as their isogenic wild-type strain, to investigate whether  $\alpha$ -,  $\beta'$ - and  $\gamma$ -COP are involved in endocytosis of the maltose transporter. Cells growing exponentially at 24°C were suspended in

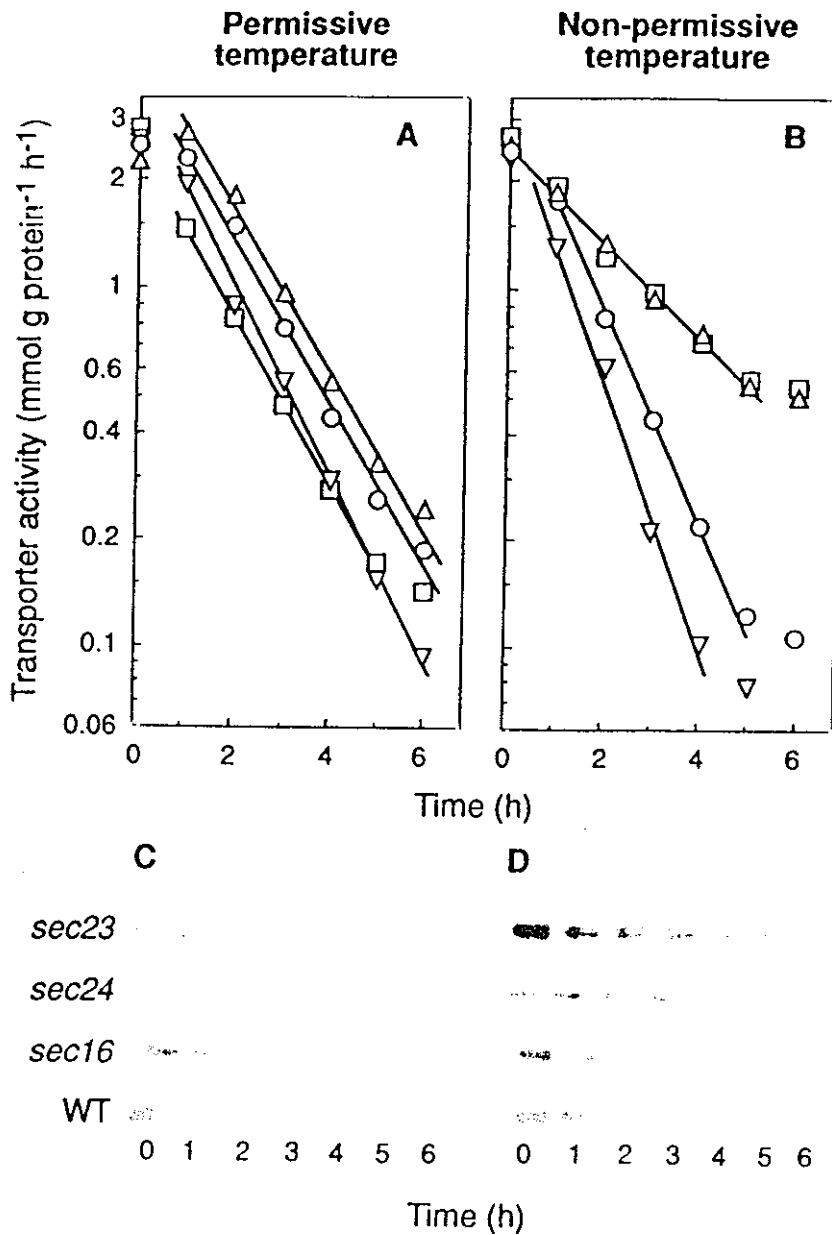


FIG. 3. Internalization and degradation of the maltose transporter in mutants defective in Sec23p, Sec24p, and Sec16p. Strains RSY255 (wild type [WT]; ○), RSY617 (*sec16-1*; ▽), RSY1196 (*sec24-1*; □), and RSY218 (*sec23-1*; △), transformed with the plasmid pRM1-1 carrying the *MAL1* locus, were grown and treated as described in the legend for Fig. 1. After incubation at 24°C (A and C) or 35°C (except for RSY617, which was incubated at 32°C) (B and D) for the indicated times, the cells were harvested and assayed for maltose transporter activity (A and B). The maltose transporter band was detected by immunoblotting aliquots containing 40 µg of protein of cellular extracts obtained at the indicated times (C and D).

the ammonium-free medium to trigger endocytosis and were separated into two aliquots that were incubated at 24 and 35°C. We found that internalization and degradation of the transporter occurred at similar rates at the two temperatures independent of the presence of a mutation in COPII genes (results not shown), thus indicating that  $\alpha$ -,  $\beta$ '-, and  $\gamma$ -COP do not play a role in endocytosis of the 12-TMS maltose transporter.

**Internalization and degradation of the transporter in mutants deficient in COPII components.** The COPII coat consists of three elements: one small GTP-binding protein, Sar1p, and two coat complexes, Sec23/24p and Sec13/31p, each one consisting of two subunits. Formation of COPII-coated vesicles

(for reviews, see references 24 and 41) begins with recruitment from the cytosol of Sar1p to the ER membrane where Sar1p exchanges GDP for GTP by the action of an integral membrane glycoprotein, Sec12p (2). Then, the Sec23-24p complex binds to Sar1p-GTP. Finally, Sec23p stimulates the GTPase activity of Sar1p and the Sec13-31p complex binds to initiate budding (50). An additional protein, Sec16p, is also essential for budding of COPII-coated vesicles, although it may not contribute directly to vesicle morphogenesis. This protein interacts with Sec23p and Sec24p and appears to act on the GTPase cycle (14). In contrast to the other COPII components mentioned above, Sec16p cannot be readily removed but re-

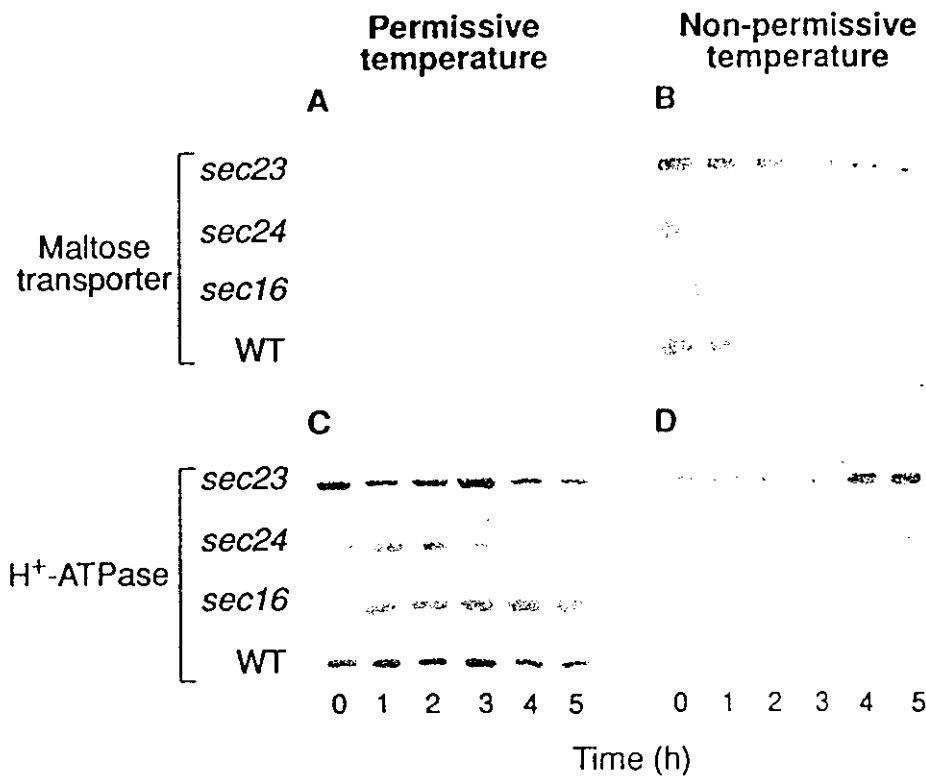


FIG. 4. Disappearance of the maltose transporter from the plasma membrane in mutants defective in Sec23p, Sec24p, and Sec16p. Strains RSY255 (wild type [WT]), RSY617 (*sec16-1*), RSY1196 (*sec24-1*), and RSY218 (*sec23-1*), transformed with the plasmid pRM1-1 carrying the *MALT* locus, were grown and treated as described in the legend for Fig. 1. After incubation at 24°C (A and C) or 35°C (except for RSY617, which was incubated at 32°C) (B and D), maltose transporter (A and B) and H<sup>+</sup>-ATPase (C and D) were detected by immunoblotting aliquots containing 7 and 3 μg of protein, respectively, of purified plasma membrane preparations obtained at the indicated times.

mains firmly associated with ER membranes (14). COPII-coated vesicles are involved in sorting of proteins from ER and intra-Golgi apparatus (for a review, see reference 24).

To investigate if some element(s) of COPII could play a role in endocytosis of the maltose transporter, we used temperature-sensitive mutants deficient in Sec23p, Sec24p, Sec13p, and Sec31p which, when exposed to the nonpermissive temperature, exhibit defective secretory functions and an excess of ER-like membrane structures (21). The results showed that *sec23* and *sec24* mutant cells exhibited, at 32 and 35°C, respectively, a reduced rate of internalization when this parameter was followed by either measuring the decrease in transport activity (Fig. 3B) or the disappearance of the transporter from the plasma membrane (Fig. 4B). In addition, and as expected from this reduction of internalization, a reduction in the rate of degradation of the transporter at the nonpermissive temperature was also observed (Fig. 3D). As in previous experiments, the H<sup>+</sup>-ATPase was used as a marker protein of plasma membrane and, in accordance with its known stability, a constant amount of this protein was detected (Fig. 4C and D). Data shown in Fig. 3A and B indicated half-life values for the transporter at 24°C of about 1 h in all strains, whereas at the nonpermissive temperatures tested, values of about 1 h in wild-type and 2.5 h in *sec23* and *sec24* strains were calculated.

These results suggest that a normal internalization of the maltose transporter requires the action of the two cytosolic proteins Sec23 and Sec24. But there is another possible explanation for the results: some *sec* mutants show inhibition of the secretory pathway even during growth at the permissive temperature (31). If *sec23* and *sec24* mutants show this inhibition,

the transporter could accumulate into the cells during growth at 24°C and, in this case, the accumulated transporter could be secreted to the plasma membrane during the endocytosis experiments. As a consequence, two processes could take place during these experiments: arrival of the transporter at the plasma membrane by secretion of the accumulated transporter and internalization of the transporter by endocytosis. The simultaneous occurrence of these two opposite processes would result in an apparent decrease in the rate of endocytosis. However, this possibility seems very unlikely, since the cells used to investigate endocytosis at both the permissive and the nonpermissive temperature came from aliquots of the same culture (see legends to Fig. 3 and 4) and should have a similar accumulation of the transporter, if any. Therefore, if the decrease in endocytosis was due to this accumulation, it would appear at both temperatures and not only at the nonpermissive one as observed.

Experiments carried out with the temperature-sensitive mutants *sec13* and *sec31* (Fig. 5 and 6) indicated that neither of the two subunits of the Sec13-31p COPII complex is required for the internalization. In addition, the results shown in Fig. 3 and 4 obtained by using a temperature-sensitive *sec16* mutant strain (21) demonstrated that Sec16p is not required for the process.

**Internalization of the α-factor receptor in a mutant deficient in Sec23p.** Previous results reported by Hicke et al. (19) suggested that a normal internalization of the α-factor receptor does not require the presence of a functional Sec23p. These results contrast with ours regarding the maltose transporter and suggest that endocytosis of these two proteins could show

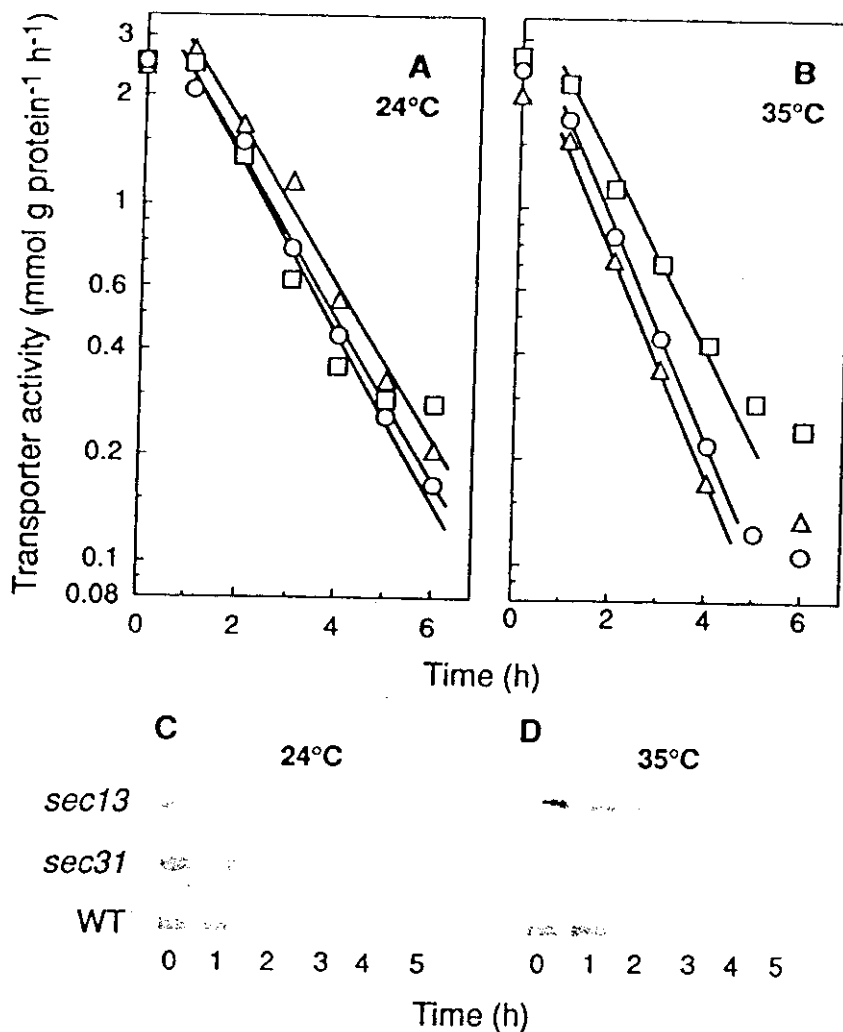


FIG. 5. Internalization and degradation of the maltose transporter in mutants defective in Sec31p and Sec13p. Strains RSY255 (wild type [WT]; ○), RSY952 (*sec31-1*; △), and RSY265 (*sec13-1*; □), transformed with the plasmid pRM1-1 carrying the *MAL1* locus, were grown and treated as described in the legend for Fig. 1. After incubation at 24°C (A and C) or 35°C (B and D) for the indicated times, the cells were harvested and assayed for maltose transporter activity (A and B). The maltose transporter band was detected by immunoblotting aliquots of cellular extracts containing 40 µg of protein that were obtained at the indicated times (C and D).

different requirements. However, this apparent difference might not be real but rather might be due to differences in the experimental conditions: whereas in the measurements of the receptor endocytosis, cells were preincubated in complete medium for 5 min at the nonpermissive temperature (19), in the measurements of the transporter endocytosis, the preincubation was performed in ammonium-free medium and lasted for several hours (Fig. 3 and 4). Therefore, to be able to compare endocytosis of the two proteins, we investigated the internalization of the  $\alpha$ -factor receptor by using experimental conditions the same as those used with the transporter and by using wild-type and *sec23* mutant strains with the appropriate genotype, *MATa bar1-1* (19). We found that the response of the receptor internalization to a shift from 24 to 32°C was similar in the wild-type and the mutant strains (Fig. 7A and B) while in parallel experiments, and in agreement with data of Fig. 3 and 4, a different response was observed in the two strains in the case of the transporter (Fig. 7C and D). These results confirmed previous findings indicating that a normal internalization of the  $\alpha$ -factor receptor does not require a functional

Sec23p (19), and they suggest that, in fact, endocytosis of this 7-TMS receptor and of the 12-TMS maltose transporter could show different requirements.

## DISCUSSION

The basic block of the clathrin coat is the triskelion, and the clathrin heavy chain is one of the two components of this basic block (43). The available evidence suggests that a deficiency in the clathrin heavy chain in yeast produces only a partial decrease in endocytosis of the 12-TMS maltose transporter (this work) and of the 7-TMS  $\alpha$ - and  $\alpha$ -factor receptors (47). Since in all instances examined in detail, a coat is used as a mechanical device to bud off vesicles (38), this partial contribution of clathrin to endocytosis suggests that, in addition to clathrin, another coat protein(s) could contribute to endocytosis in this organism. A similar conclusion has been reached with regard to animal cells in which  $\beta$ -COP was found in endosomes (1), microinjection of anti- $\beta$ -COP antibodies inhibited the entry of viruses by endocytosis (49), and a defect of  $\epsilon$ -COP was accom-

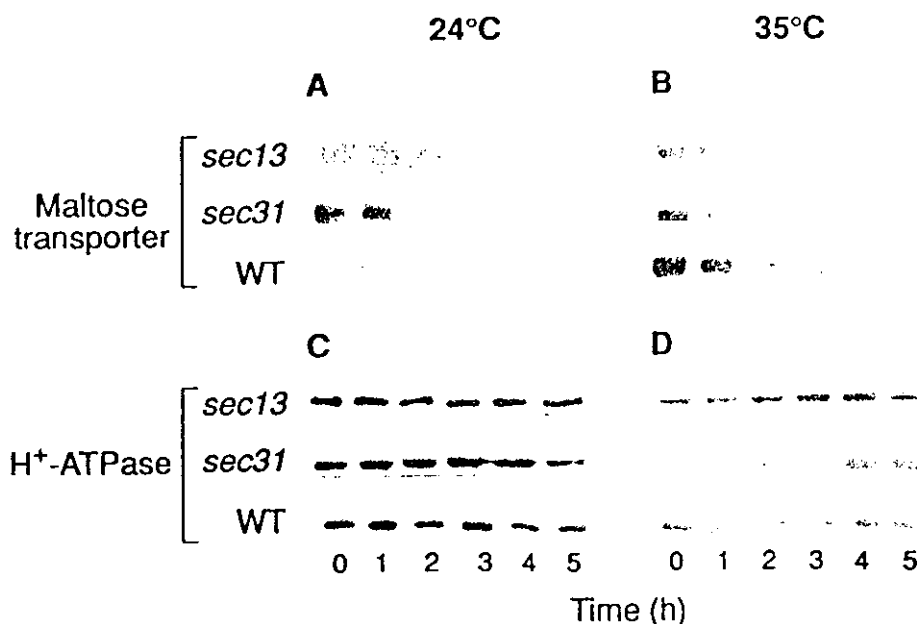


FIG. 6. Disappearance of the maltose transporter from the plasma membrane in mutants defective in Sec31p and Sec13p. Strains RSY255 (wild type [WT]), RSY952 (*sec31-1*), and RSY265 (*sec13-1*), transformed with the plasmid pRMI-1 carrying the *MAL1* locus, were grown and treated as described in the legend for Fig. 1. After incubation at 24°C (A and C) or 35°C (B and D) maltose transporter (A and B) and H<sup>+</sup>-ATPase (C and D) were detected by immunoblotting aliquots containing 7 and 3 μg of protein, respectively, of purified plasma membrane preparations obtained at the indicated times.

panied by a defect in endocytosis (16). In the case of yeast, the results indicate that α-, β<sup>+</sup>-, and γ-COPI are involved neither in endocytosis of the maltose transporter (this work) nor in endocytosis of the α-factor receptor (19), but the possibility that another COPI subunit(s) plays a role in endocytosis of these proteins cannot be ruled out.

The results obtained with mutants deficient in Sec23p and Sec24p suggest that a normal internalization of the maltose transporter could require the action of these two subunits of the COPII complex. The possibility that these two cytosolic coat proteins play a direct role in the formation of endocytic vesicles containing the transporter in yeast cells seems very attractive. These two proteins, independent of the other COPII components, might be recruited from the cytosol onto the plasma membrane to facilitate invagination. But an indirect effect of these proteins in internalization of the transporter cannot be excluded.

A variety of proteins involved in early and late secretory pathway have been investigated for their role in α-factor endocytosis (19). Apparently, some of these proteins, i.e., Sec12, Sec13, Sec16, Sec17, Sec20, Sec23, Sec7, and Sec14, were required for a normal degradation of the α-factor in the vacuole through their effect in traffic from early to late endosomes. But none of these proteins was found to be required for internalization of the α-factor receptor (19). This observation, which in the case of Sec23p was confirmed in our experimental conditions, contrasts with the results obtained with the maltose transporter, which suggests a role of Sec23p and Sec24p in the internalization of the transporter. In our experiments with the transporter (this work) and in those with the α-factor receptor (this work and reference 19), the same mutant allele of the *SEC23* gene (*sec23-1*) was used. Therefore, whether Sec23p plays a direct or an indirect role in internalization, what seems clear is that a mutation in gene *SEC23* differentially affects internalization of the transporter and of the α-factor receptor. Interestingly, a mutation in another gene has also been found

to differentially affect the internalization of these two proteins: *sec18-1* cells showed a normal internalization of the pheromone (37) whereas these cells were severely affected in internalization of the transporter (35). There is not a simple explanation for this different response to *sec* mutations of plasma membrane proteins. In this regard, one interesting question which has not yet received a clear answer is whether vesicles formed at a given cellular compartment are all the same or whether different types of vesicles exist (for a review, see reference 22). In yeast cells, evidence for at least two classes of secretory vesicles has been reported (17). These two classes of vesicles, although they use a common fusion machinery, show different cargo proteins and different coat composition, as suggested by their different densities (17). Regarding endocytosis, there is not evidence for the occurrence of distinct endocytic vesicles in yeast, but in animal cells four different classes of these vesicles which seem to differ in size, coat composition, cargo proteins, and sensitivity to a variety of inhibitors have been detected (5). The relative contribution of these vesicles to endocytosis may vary between cells and change in response to stimuli (5). Therefore, one possibility is that, in yeast, the different response of plasma membrane proteins to factors involved in protein traffic could be due to the occurrence of different classes of endocytic vesicles, the formation of which could respond to different stimuli. Consistent with this possibility is the observation that the carboxyl terminus of the α-factor receptor is required for constitutive but not for ligand-stimulated endocytosis (9), indicating that the two processes involve different parts of the receptor protein and, probably, different components of the endocytic machinery.

In conclusion, the results shown in this work indicate that clathrin and two cytosolic components of the COPII complex, Sec23p and Sec24p, could play a role in internalization of the yeast maltose transporter and that internalization of this 12-TMS transporter and of the 7-TMS α-factor receptor could have different requirements.

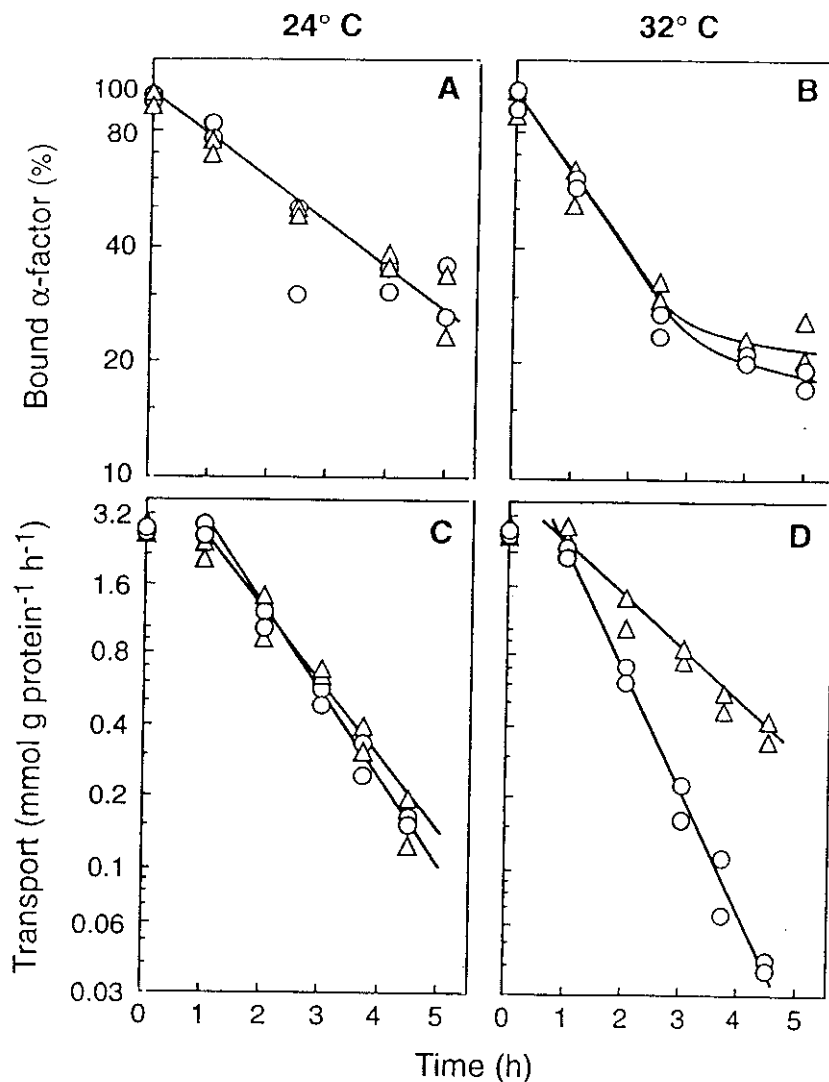


FIG. 7. Internalization of the  $\alpha$ -factor receptor and of the maltose transporter in a mutant deficient in Sec23p. Strains RH448 (wild type; O) and RH1416 (*sec23-1*;  $\Delta$ ), transformed with the plasmid pRM1-1 carrying the *MAL1* locus, were grown and treated as described in the legend for Fig. 1. After incubation at 24 or 32°C for the indicated times, the cells were harvested and assayed for internalization of the  $\alpha$ -factor receptor with <sup>35</sup>S-labeled  $\alpha$ -factor (A and B). Internalization of the maltose transporter was monitored in parallel experiments by measuring the decrease in transport activity (C and D). Data of two experiments are shown.

#### ACKNOWLEDGMENTS

The experiments with the  $\alpha$ -factor receptor were performed in the laboratory of H. Riezman in Basel, Switzerland. We are indebted to H. Riezman for this, and also for his generous help and advice during the performance of these experiments. We are also very grateful to M. Herweijer and R. Serrano for the gift of the polyclonal antibodies against the maltose transporter and the plasma membrane ATPase, to M. J. LaFuente for her generous help and suggestions, to A. Fernández and J. Pérez for help in the preparation of the figures, and to J. M. Gancedo and M. J. Mazón for critical readings of the manuscript.

This work was supported by the Spanish Dirección General Científica y Técnica (PB97-1213-CO2-01) and by the European Commission (BIO4-CT95-01).

#### REFERENCES

- Aniento, F., F. Gu, R. G. Parton, and J. Gruenberg. 1996.  $\beta$ -COP is present on endosomes and enables the formation of vesicles that ensure transport from early to late endosomes. *J. Cell Biol.* 133:29-41.
- Barlowe, C., and R. Schekman. 1993. *SEC12* encodes a guanine nucleotide exchange factor essential for transport vesicle budding from the ER. *Nature* 365:347-349.
- Bednarek, S. Y., M. Ravazzola, M. Hosobuchi, M. Amherdt, A. Perrelet, R. Schekman, and L. Orci. 1995. COPI- and COPII-coated vesicles bud directly from the endoplasmic reticulum in yeast. *Cell* 83:1183-1196.
- Benito, B., E. Moreno, and R. Lagunas. 1991. Half-life of the plasma membrane ATPase and its activating system in resting yeast cells. *Biochim. Biophys. Acta* 1063:265-268.
- Bishop, N. E. 1997. An update on non-clathrin-coated endocytosis. *Rev. Med. Virol.* 7:199-209.
- Busturia, A., and R. Lagunas. 1986. Catabolite inactivation of the glucose transport system in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Gen. Microbiol.* 132:379-385.
- Cheng, Q., and C. A. Michels. 1989. The maltose permease encoded by *MAL61* gene of *Saccharomyces cerevisiae* exhibits both sequence and structural homology to the sugar transporters. *Genetics* 123:477-484.
- Casson, P., and F. Letourneur. 1997. Coatomer (COP1)-coated vesicles: role in intracellular transport and protein sorting. *Curr. Opin. Cell Biol.* 9:484-487.
- Davis, N. G., J. L. Horecka, and G. F. Sprague. 1993. *cis*- and *trans*-acting functions required for endocytosis of the yeast pheromone receptors. *J. Cell Biol.* 122:53-65.
- Dohlman, H. G., J. Throner, M. G. Caron, and R. J. Lefkowitz. 1991. Model systems for the study of seven-transmembrane-segment receptors. *Annu. Rev. Biochem.* 60:653-688.
- Duden, R., M. Hosobuchi, S. Hamamoto, S. Winey, B. Byers, and R. Schekman. 1994. Yeast  $\beta$ - and  $\beta'$ -coat proteins (COP). Two coatomer subunits



- essential for endoplasmic reticulum-to-Golgi protein traffic. *J. Biol. Chem.* 269:24486-24495.
12. Dulic, V., M. Egerton, I. Elguindi, S. Raths, B. Singer, and H. Riezman. 1991. Yeast endocytosis assays. *Methods Enzymol.* 194:697-710.
  13. Egner, R., Y. Mahé, R. Pandjaitan, and K. Kuchler. 1995. Endocytosis and vacuolar degradation of the plasma membrane-localized Pdr5 ATP-binding cassette multidrug transporter in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell Biol.* 15:5789-5887.
  14. Espenshade, P., R. E. Gimeno, E. Holzmacher, P. Teung, and C. A. Kaiser. 1995. Yeast *SEC16* gene encodes a multidomain vesicle coat protein that interacts with Sec 23p. *J. Cell Biol.* 131:311-324.
  15. Gerich, B., L. Orci, H. Tschöchner, F. Lottspeich, M. Ravazzola, M. Amherdt, F. Wieland, and C. Harter. 1995. Non-clathrin-coat protein  $\alpha$ -COP1 is a conserved subunit of coatomer and in *Saccharomyces cerevisiae* is essential for growth. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:3229-3233.
  16. Guo, Q., E. Vasile, and M. Krieger. 1994. Disruptions in Golgi structure and membrane traffic in a conditional lethal mammalian cell mutant are corrected by  $\epsilon$ -COP. *J. Cell Biol.* 125:1213-1224.
  17. Harsay, E., and A. Bretscher. 1995. Parallel secretory pathways to the cell surface in yeast. *J. Cell Biol.* 131:297-305.
  18. Hein, C., J. Y. Springael, C. Volland, R. Haguenaer-Tsapis, and B. André. 1995. *NPI1*, an essential yeast gene involved in induced degradation of Gap1 and Fur4 permeases, encodes Rsp5 ubiquitin-protein ligase. *Mol. Microbiol.* 18:77-87.
  19. Hicke, L., B. Zanolari, M. Pypaert, J. Rohrer, and H. Riezman. 1997. Transport through the yeast endocytic pathway occurs through morphologically distinct compartments and requires an active secretory pathway and Sec18p/N-ethylmaleimide-sensitive fusion protein. *Mol. Biol. Cell* 8:13-31.
  20. Hosobuchi, M., T. Kreis, and R. Schekman. 1992. *SEC21* is a gene required for ER to Golgi protein transport that encodes a subunit of a yeast coatomer. *Nature* 360:603-605.
  21. Kaiser, C., and R. Schekman. 1990. Distinct sets of *SEC* genes govern transport vesicle formation and fusion early in the secretory pathway. *Cell* 61:723-733.
  22. Kaiser, C. A., R. E. Gimeno, and D. A. Shaywitz. 1997. Protein secretion, membrane biogenesis, and endocytosis, p. 91-227. *In* J. R. Pringle, J. R. Broach, and W. Jones (ed.), *Molecular and cellular biology of the yeast Saccharomyces*, vol. 3. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
  23. Kölling, R., and C. P. Hollenberg. 1994. The ABC-transporter Ste6 accumulates in the plasma membrane in a ubiquitinated form in endocytosis mutants. *EMBO J.* 13:3261-3271.
  24. Kuehn, M. J., and R. Schekman. 1997. COP1 and secretory cargo capture into transport vesicles. *Curr. Opin. Cell Biol.* 8:477-483.
  25. Lagunas, R. 1993. Sugar transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol. Rev.* 104:229-242.
  26. Lai, K., C. P. Bolognese, S. Swift, and P. McGraw. 1995. Regulation of inositol transport in *Saccharomyces cerevisiae* involves inositol-induced changes in permease stability and endocytic degradation. *J. Biol. Chem.* 270:2525-2534.
  - 26a. Letourneur, F., E. C. Gaynor, S. Hennecke, C. Demollière, R. Duden, S. D. Emr, H. Riezman, and P. Cosson. 1994. Coatomer is essential for retrieval of dilysine-tagged proteins to the endoplasmic reticulum. *Cell* 79:1199-1207.
  27. Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr, and R. J. Randall. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193:265-275.
  28. Lucero, P., and R. Lagunas. 1997. Catabolite inactivation of the yeast maltose transporter requires ubiquitin-ligase *npi1/rsp5* and ubiquitin-hydrolase *npi2/doa4*. *FEMS Microbiol. Lett.* 147:273-277.
  29. Lucero, P., E. Peñalver, E. Moreno, and R. Lagunas. 1997. Moderate concentrations of ethanol inhibit endocytosis of the yeast maltose transporter. *Appl. Environ. Microbiol.* 63:3831-3836.
  30. Medintz, L., H. Jiang, E. K. Han, W. Cui, and C. A. Michels. 1996. Characterization of the glucose-induced inactivation of maltose permease in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* 178:2245-2254.
  31. Novick, P., S. Ferro, and R. Schekman. 1980. Order of events in the yeast secretory pathway. *Cell* 25:461-469.
  32. Peñalver, E., L. Ojeda, E. Moreno, and R. Lagunas. 1997. Role of the cytoskeleton in endocytosis of the yeast maltose transporter. *Yeast* 13:541-549.
  33. Peñalver, E., P. Lucero, E. Moreno, and R. Lagunas. 1998. Catabolite inactivation of the maltose transporter in nitrogen starved cells could be due to the stimulation of the general protein turnover. *FEMS Microbiol. Lett.* 166:317-324.
  34. Raths, S., J. Rohrer, F. Crausaz, and H. Riezman. 1993. *end3* and *end4*: two mutants defective in receptor-mediated endocytosis in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Biol.* 120:55-65.
  35. Riballo, E., M. Herweijer, D. H. Wolf, and R. Lagunas. 1995. Catabolite inactivation of the yeast maltose transporter occurs in the vacuole after internalization by endocytosis. *J. Bacteriol.* 177:5622-5627.
  36. Riballo, E., and R. Lagunas. 1994. Involvement of endocytosis in catabolite inactivation of the  $K^+$  and glucose transport systems in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol. Lett.* 121:77-80.
  37. Riezman, H. 1993. Yeast endocytosis. *Trends Cell Biol.* 3:273-277.
  38. Robinson, M. S. 1997. Coats and vesicle budding. *Trends Cell Biol.* 7:90-102.
  39. Rodicio, R. 1986. Insertion of non-homologous DNA sequences into a regulatory gene causes a constitutive maltase synthesis in yeast. *Curr. Genet.* 11:235-241.
  40. Rohrer, J., H. Bénédetti, B. Zanolari, and H. Riezman. 1993. Identification of a novel sequence mediating regulated endocytosis of the G protein-coupled  $\alpha$ -pheromone receptor in yeast. *Mol. Biol. Cell* 4:511-521.
  41. Rothman, J. E., and L. Orci. 1992. Molecular dissection of the secretory pathway. *Nature* 355:409-415.
  42. Rothman, J. E., and F. T. Wieland. 1996. Protein sorting by transport vesicles. *Science* 272:227-234.
  43. Schmid, S. L. 1997. Clathrin-coated vesicle formation and protein sorting. *Annu. Rev. Biochem.* 65:511-545.
  44. Seeger, M., and G. S. Payne. 1992. A role for clathrin in the sorting of vacuolar proteins in the Golgi complex of yeast. *EMBO J.* 11:2811-2818.
  45. Serrano, R. 1988.  $H^+$ -ATPase from plasma membrane of *Saccharomyces cerevisiae* and *Avena sativa* roots. Purification and reconstitution. *Methods Enzymol.* 157:533-544.
  46. Stenbeck, G., R. Schreiner, D. Herrmann, S. Aubarch, F. Lottspeich, J. E. Rothman, and F. T. Wieland. 1992.  $\gamma$ -COP, a coat subunit of non-clathrin-coated vesicles with homology to sec21p. *FEBS Lett.* 314:195-198.
  47. Tan, P. K., N. G. Davis, G. F. Sprague, and G. S. Payne. 1993. Clathrin facilitates the internalization of seven transmembrane segment receptors for mating pheromones in yeast. *J. Cell Biol.* 123:1707-1716.
  48. Volland, C., D. Urban-Grimal, G. Géraud, and R. Haguenaer-Tsapis. 1994. Endocytosis and degradation of the yeast uracil permease under adverse conditions. *J. Biol. Chem.* 269:9833-9841.
  49. Whitney, J. A., M. Gomez, D. Sheff, T. E. Kreis, and I. Mellman. 1995. Cytoplasmic coat proteins involved in endosome function. *Cell* 83:703-713.
  50. Yoshihisa, T., C. Barlowe, and R. Schekman. 1993. Requirement for a GTPase-activating protein in vesicle budding from the endoplasmic reticulum. *Science* 259:1466-1468.
  51. Zanolari, B., S. Raths, B. Singer-Krüger, and H. Riezman. 1992. Yeast pheromone receptor endocytosis and hyperphosphorylation are independent of G protein-mediated signal transduction. *Cell* 71:755-763.