

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE FARMACIA
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA II

**Mecanismo de inactivación catabólica de
las proteínas de membrana plasmática de
Saccharomyces cerevisiae.**

Memoria que, para optar al Grado de Doctor en
Farmacia, presenta la licenciada
M^ª Enriqueta Riballo Fernández

Directora de Tesis
Dra. Rosario Lagunas Gil
Profesora de Investigación

Instituto de Investigaciones Biomédicas
del C.S.I.C.

Madrid, 1995

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo se ha desarrollado en el Instituto de Investigaciones Biomédicas del C.S.I.C. durante cuatro años. En este tiempo he tenido la oportunidad de trabajar en compañía de personas que no sólo me han ayudado en el terreno científico sino que además han conseguido que estos cuatro años hayan sido muy, muy cortos.

A mis padres, a su esfuerzo y a su empeño; porque sin ellos yo no hubiese llegado hasta aquí. Y porque, además del Ministerio de Educación y los contribuyentes, la "Fundación Riballo" ha contribuido al soporte económico de esta Tesis. A mis hermanos Juan y Toni, y a Paqui y Merche, para que siempre me hagan volver la vista hacia el Sur.

Me gustaría agradecer sinceramente a la Dra. Rosario Lagunas la dirección eficaz de esta Tesis. Por permitirme unirme a su grupo, por su afán en corregirme y por la moda que ha intentado instaurar en mí: los tirantes y el cinturón.

El que aprendiera a pipetear, diluir y centrifugar se lo debo a Lali. Por la paciencia demostrada en los experimentos que hizo conmigo ($2P < 0.05$) y los buenos ratos que hemos pasado discutiendo.

A todos los que durante estos años han compartido conmigo el 1.3.1: a Lourdes (y a Cariño y a los niños), a Luis, siempre mi contrapunto, y a Pilar, el Lucero del 1.3.1, porque desde el principio supo brillar con luz propia. A nuestros vecinos del 1.3.2, a Cote y a sus chistes, y a Jorge, por sus esfuerzos para arreglar el mundo.

A todo el grupo de levaduras del I.I.B., a Patrick, por su ayuda con los geles, a Vicky, a Loli y Anita, por el momento más dulce del día. A la Dra. Mazón por su colaboración en parte de esta Tesis y por sus ánimos para el futuro. Al laboratorio 1.1 y a todos los que han pasado por él, a Juanjo, Pilar y Margarida; a los Dres. Gancedo, por sus enseñanzas y sus críticas, a Javier y a Pepa, y a los recién llegados, Javier y Thomas. A Miguel, por estar siempre al final del pasillo.

Empezar en el I.I.B. no fue nada difícil porque conmigo estaban las "tamaño estándar", Rosalía y Angeles; Olivier, que siempre buscó el camino más fácil; Antonio, capaz de acercarse cualquier punto del mapa y Julián, que siempre ha sufrido mis "cambios de humor".

A todos los que formaron el equipo desayuno, y en especial a 'Léxpuru, Joserra, Juanan y al horóscopo de EL MUNDO, porque aunque nos planeaba los días en el I.I.B. jamás pudo planearnos las noches en la Norte.

A los guiris, Fabrizio y Claudia, por estar siempre pendientes de mí.

A todos los que llenarían una página por ser el soporte alternativo a la investigación: Dr. Bengu, Maribel, Dévora, Borja, Juanan, Antonio... A las chicas del microondas, Ana, Anabel y Lourdes.

A la Dra. Amparo Cano, a los chicos del 1.7 y del 2.3.1, por su ayuda en los experimentos de inmunofluorescencia.

A todos los que hacen que el I.I.B. funcione, a Antonio, Elena, Javier y J. Puche; a Mari Paz y a mi secretaria "favoggita" Renée.

A mis amigos del "mundo exterior" a Mati, Javier, Raimundo, Elena... A Fede, el contacto en Farmacia. Al apoyo moral de Toledo. Al cálculo de estructuras, las alas de los aviones, las curvas de los puentes, el correo electrónico... a la Prospe, por los viernes de Bodeguilla y los domingos de Trivial.

A mi trío favorito, María Jesús, Ana y Lola.

INDICE

ABREVIATURAS

RESUMEN	1
SUMMARY	2
INTRODUCCION	3
1. Proteínas de transporte de la membrana plasmática.....	3
1.1. Los transportadores de azúcares en levadura y su regulación. La inactivación catabólica.	4
1.2. Características del transporte de K ⁺	6
2. Papel de la PKA en la inactivación catabólica.	7
2.1. La proteína quinasa dependiente de cAMP.....	8
2.2. La PKA en la inactivación catabólica de los transportadores de azúcares.....	10
3. Mecanismos de degradación de proteínas de membrana.	11
3.1. La endocitosis en levadura.....	12
3.2. La vacuola.	16
3.3. El proteasoma.	16
3.4. La vía de la ubiquitina.....	17
OBJETIVOS	19
MATERIALES Y METODOS	20
1. MATERIALES.....	20
1.1. Productos.....	20
1.1.1. Isótopos radiactivos.	20
1.1.2. Productos para la preparación de geles de SDS-poliacrilamida.	20
1.1.3. Tinciones.	20
1.1.4. Detección inmunológica.....	20
1.1.5. Inhibidores.	20
1.1.6. Otros productos.....	21
1.2. Equipo instrumental.	21
1.3. Medios de cultivo.....	21
1.3.1. Medios para <i>S. cerevisiae</i>	22
1.3.2. Medios para <i>E. coli</i>	22
1.4. Material biológico.....	23
1.4.1. Cepas de <i>S. cerevisiae</i>	23
1.4.2. Cepa de <i>E. coli</i>	23
1.4.3. Plásmido.....	23
2. METODOS	25
2.1. Condiciones de cultivo.....	25

2.1.1. Conservación.....	25
2.1.2. Cultivo.....	25
2.1.3. Determinación del crecimiento.....	26
2.2. Condiciones de inactivación.....	26
2.3. Medida de los transportes.....	26
2.3.1. Transportes de azúcares.....	26
2.3.2. Transporte de K ⁺	28
2.4. Medida cualitativa de endocitosis.....	30
2.5. Obtención de fracciones celulares.....	31
2.5.1. Soluciones empleadas.....	31
2.5.2. Extracto crudo.....	31
2.5.3. Fracción cruda de membrana.....	32
2.5.4. Fracción purificada de membrana plasmática.....	32
2.6. Valoración de actividades enzimáticas.....	33
2.6.1. H ⁺ -ATPasa.....	33
2.6.2. Proteína kinasa dependiente de cAMP.....	34
2.7. Determinación del contenido de proteína.....	36
2.7.1. Método de Lowry.....	36
2.7.2. Método de Bradford.....	36
2.8. Métodos inmunológicos.....	37
2.8.1. Electroforesis en geles de poliacrilamida.....	37
2.8.2. Transferencia.....	39
2.8.3. Inmunodetección.....	41
2.8.4. Purificación de anticuerpo por afinidad con antígeno inmovilizado en nitrocelulosa.....	43
2.8.5. Inmunofluorescencia.....	45
2.9. Técnicas de biología molecular.....	47
2.9.1. Transformación de <i>E. coli</i>	47
2.9.2. Aislamiento de DNA plasmídico de <i>E. coli</i>	48
2.9.3. Transformación de células intactas de <i>S. cerevisiae</i>	51
RESULTADOS	53
1. INACTIVACION CATABOLICA DEL TRANSPORTADOR DE K ⁺	53
1.1. Puesta a punto del método de valoración.....	53
1.2. Inactivación catabólica.....	56
1.2.1. Efecto de la inhibición de la síntesis de proteínas sobre la actividad del transportador de K ⁺ , en presencia y ausencia de un	

sustrato fermentable.....	56
1.2.2.Efecto de la inhibición de la síntesis de proteínas sobre la afinidad del transportador de K ⁺	58
1.2.3.Dependencia de energía.....	60
1.3.Efecto de la inactivación de la H ⁺ -ATPasa sobre la actividad del transportador de K ⁺	60
1.4.Discusión.....	64
1.5.Conclusiones.....	68
2.EFECTO DE LA PROTEINA KINASA DEPENDIENTE DE cAMP EN LA INACTIVACION CATABOLICA DE LOS TRANSPORTADORES DE AZUCARES.....	70
2.1.Actividad PKA de las cepas utilizadas.....	70
2.2.Efecto de la PKA en la expresión del transportador de maltosa.....	71
2.3.Efecto de la PKA en la inactivación catabólica del transportador de maltosa. ...	74
2.4.Efecto de la PKA en la degradación del transportador de maltosa.....	74
2.5.Efecto de la PKA en la inactivación catabólica de los transportadores de glucosa y galactosa.....	78
2.6.Discusión.....	83
2.7.Conclusiones.....	86
3.MECANISMO DE DEGRADACION DE LAS PROTEINAS DE MEMBRANA PLASMATICA DURANTE LA INACTIVACION CATABOLICA.....	87
3.1.Relación entre endocitosis e inactivación catabólica del transportador de maltosa.....	87
3.2.Relación entre endocitosis y degradación del transportador de maltosa.....	90
3.3.Relación entre endocitosis e inactivación catabólica de otros transportadores.....	90
3.3.1.Relación entre la inactivación catabólica del transportador de glucosa y la endocitosis.....	92
3.3.2.Relación entre la endocitosis y la inactivación catabólica del transportador de K ⁺	96
3.4.Papel del proteasoma en la inactivación catabólica del transportador de maltosa.....	99
3.5.Papel de la vacuola en la inactivación catabólica del transportador de maltosa.....	102
DISCUSION	109
CONCLUSIONES.....	115

BIBLIOGRAFIA	116
ANEXO: copia de los artículos publicados	127

ABREVIATURAS

ABREVIATURAS

ATP	adenosina-5'-trifosfato
BCIP	5-bromo-4-cloro-3-indolil-fosfato
BSA	seroalbúmina bovina
cAMP	adenosina-5'-monofosfato cíclico
DAPI	4,6-diamidino-2-fenilindol
DEEB	dietil estil bestrol
DO	densidad óptica
DTE	2,3-dihidroxi-butano-1,4 ditiol
EDTA	ácido etilendiaminotetracético
EGTA	ácido etilenglicol- <i>bis</i> -(β -aminoetiléter) N,N,N',N'-tetracético
Hepes	ácido (N-(2-hidroxietil) piperacina-N'-(2-etanosulfónico)
IAA	ácido iodoacético
LY	lucifer yellow
MES	ácido 2-(N-morfolino)-etanosulfónico
NBT	azul de nitrotetrazolio
P _i	fosfato inorgánico
PKA	proteína kinasa dependiente de cAMP
PMSF	fluoruro de fenilmetilsulfonilo
PS	peso seco
SDS	dodecil sulfato sódico
STI	inhibidor de la tripsina de soja
TCA	ácido tricloroacético
TEMED	N,N,N',N'-tetrametiletildiamina
Tris	tris (hidroximetil)-aminometano

RESUMEN / SUMMARY

RESUMEN

Los transportadores de azúcares en *S. cerevisiae* se inactivan irreversiblemente cuando se inhibe la síntesis de proteínas. Esta inactivación, conocida en la literatura como "inactivación catabólica", se debe a cambios en la V_{max} , sigue una cinética de primer orden, es dependiente de energía y estimulada por la presencia de un sustrato fermentable. Este fenómeno se debe a una proteólisis de los transportadores y se ha calculado que la vida media de la actividad de estas proteínas oscila entre 1 y 5 horas. Se ha investigado si esta inactivación es una peculiaridad de los transportadores de azúcares o si por el contrario afecta a otras proteínas de membrana plasmática. Los resultados obtenidos con el sistema de transporte de K^+ indican que la inactivación catabólica podría ser una característica común a otras proteínas de membrana. Por otra parte se ha demostrado que, en contra de resultados publicados por otros autores, esta inactivación no requiere la actividad de la proteína quinasa dependiente de cAMP.

Mediante el uso de mutantes con la velocidad de endocitosis alterada se ha demostrado que la proteólisis responsable de la inactivación tiene lugar en el interior celular tras la internalización de los transportadores. Además, mediante el uso de mutantes que tienen alteradas las funciones proteolíticas del proteasoma y de la vacuola, se ha establecido que la inactivación ocurre en la vacuola independientemente de la función del proteasoma.

SUMMARY

The sugar transporters in *S. cerevisiae* are irreversibly inactivated upon inhibition of protein synthesis. This inactivation, that is known in the literature as "catabolite inactivation", is due to changes in the V_{max} , follows first order kinetics, is energy dependent and is stimulated by the presence of fermentable substrates. This inactivation is due to the proteolysis of the transporters and it has been calculated that the half-life value of the activities of these proteins ranges from 1 to 5 hours. We have investigated if catabolite inactivation is a peculiarity of the sugar transporters or also affects to other plasma membrane proteins. The results obtained with the K^+ transporter show that this inactivation may be a common characteristic to other plasma membrane proteins. In addition, we have found that, in contrast to results published by other authors, catabolite inactivation of the sugar transporters does not require activity of the cAMP-dependent protein kinase.

Using mutants with an altered rate of endocytosis we have shown that the proteolysis responsible for the inactivation of the maltose transporter takes place inside the cell after internalization of this protein by endocytosis. In addition, using mutants with altered function of the proteasome and the vacuole, we have shown that this proteolysis occurs in the vacuole, independently of the proteasome function.

INTRODUCCION

INTRODUCCION

1. Proteínas de transporte de la membrana plasmática.

La membrana plasmática es la estructura que define la extensión de la célula y permite mantener diferencias entre el contenido de ésta y el medio que la rodea. A través de ella pasan al interior celular los nutrientes, se expulsan los productos residuales y se secretan algunas proteínas. Estos procesos se llevan a cabo de forma selectiva ya que la permeabilidad de la membrana es muy limitada. Por eso la mayoría de los nutrientes entran en la célula a través de sistemas específicos de transporte. Existen dos tipos de proteínas implicadas en el transporte: canales y transportadores o permeasas. Los canales son proteínas que permiten el paso a su través de solutos de tamaño y carga apropiados mediante un transporte pasivo que no necesita energía y que se detiene cuando se igualan la concentración de soluto en la célula y en el medio. Los canales contienen sitios de unión al sustrato que determinan su especificidad pero no sufren cambio conformacional durante el proceso. Por el contrario, los transportadores existen en dos estados conformacionales en los cuales el sitio de unión al sustrato aparece expuesto hacia uno u otro lado de la membrana. Estas proteínas pueden llevar a cabo una difusión facilitada o un transporte activo. En el caso de la difusión facilitada los solutos son transportados a favor de gradiente de concentración y el proceso se detiene cuando la concentración intracelular es igual a la concentración extracelular. Es un transporte pasivo que no requiere energía celular. Sin embargo, en el transporte activo los solutos se transportan en contra de un gradiente de concentración y se requiere un aporte de energía por parte de la célula. Existen transportadores activos primarios y secundarios. Los primarios son las ATPasas que utilizan la energía liberada en la hidrólisis del ATP para bombear iones hacia dentro o fuera de la célula, creando así un gradiente eléctrico. Esta energía, almacenada en forma de potencial de membrana, es utilizada por los transportadores secundarios para catalizar el paso de moléculas acopladas al movimiento de un catión. Tanto el sustrato como el catión utilizan el mismo transportador y pueden moverse en la misma dirección o en dirección opuesta. En el primer caso se denominan co-transportadores y en el segundo anti-transportadores.

Dentro de los transportadores destacan por su importancia los transportadores de azúcares. Todas las células conocidas hasta ahora contienen en su membrana plasmática este tipo de transportes. En la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, organismo unicelular y eucariota, los transportes de azúcares han sido ampliamente investigados. La glicolisis constituye la principal vía de obtención de energía en este organismo y la importancia de los sistemas de transporte de azúcares reside en constituir el primer punto de control de dicha vía (Lagunas *et al.*, 1982; Gancedo y Serrano, 1989). De hecho la regulación de estos transportadores es una de las principales estrategias que emplea *Saccharomyces* para adaptarse a los cambios del medio.

1.1. Los transportadores de azúcares en levadura y su regulación. La inactivación catabólica.

Los transportes de azúcares en levadura están regulados al menos por dos tipos diferentes de mecanismos, los que afectan a su actividad y los que afectan a su contenido. En relación con los primeros se sabe muy poco (Lagunas, 1993). Se ha observado que variaciones en las condiciones fisiológicas, por ejemplo el paso de aerobiosis a anaerobiosis o la carencia de una fuente de nitrógeno, producen cambios rápidos y reversibles en la actividad de estos transportes (Lagunas *et al.*, 1982; Serrano y DelaFuente, 1974; Loureiro-Dias y Peinado, 1984). En lo que se refiere al contenido en la célula de estas proteínas se sabe que su síntesis está controlada por procesos de represión y de inducción. En el caso de la represión la presencia de glucosa en el medio impide la expresión de los genes que codifican algunos de estos transportadores. Por otra parte en ausencia de glucosa y en presencia del sustrato correspondiente, se activa la transcripción de algunos de estos genes (Bisson y Fraenkel, 1984; Johnston, 1987; Gancedo, 1992; Charron *et al.*, 1986). Con este mecanismo, la célula adapta su catabolismo de forma relativamente lenta a los cambios de la fuente de carbono presente en el medio.

Los transportadores de azúcares sufren además un proceso de inactivación rápido, conocido como "inactivación catabólica" (Holzer, 1976) que presenta características similares a la inactivación descrita para ciertas proteínas intracelulares y que es un proceso por el cual su

actividad disminuye al añadir al medio de cultivo glucosa u otro azúcar fácilmente metabolizable. En el caso de los transportadores de azúcares la inactivación catabólica requiere la inhibición de la síntesis de proteínas, además de la presencia de un sustrato fermentable. Se ha visto que esta inactivación afecta principalmente a la V_{max} , es irreversible, sigue una cinética de primer orden, es dependiente de energía y se ha calculado que la vida media de la actividad de estas proteínas oscila entre 1 y 5 horas (Busturia y Lagunas, 1985; Busturia y Lagunas, 1986; DeJuan y Lagunas, 1986). Todas estas características sugerían que esta inactivación podía ser debida a proteolisis, hecho que ha sido recientemente demostrado en nuestro laboratorio (Lucero *et al*, 1993). Así se ha visto, mediante el uso de anticuerpos frente al transportador de maltosa, que la inhibición de la síntesis de proteínas, bien por ausencia de una fuente de nitrógeno en el medio de cultivo, bien por adición de un inhibidor como la cicloheximida, produce un descenso de la actividad de este transportador en células que se hallan fermentando. Este descenso en la actividad va acompañado de un descenso paralelo en el contenido celular del transportador (Lucero *et al*, 1993). El mecanismo por el que tiene lugar esta proteolisis y el compartimento celular en el que se lleva a cabo eran desconocidos cuando iniciamos nuestro trabajo y su esclarecimiento ha sido uno de los objetivos de esta Tesis .

Durante un tiempo se pensó que la inactivación catabólica de los transportadores de azúcares en levadura podía ser un mecanismo de control específico de estas proteínas. Sin embargo una inactivación con características similares a la demostrada para los transportes de azúcares, si bien mucho más lenta, fue observada en el caso de otra proteína de membrana plasmática, la H^+ -ATPasa, que mostró una vida media de aproximadamente 11 horas (Benito *et al*, 1991). El hecho de que esta enzima presentase una inactivación con características semejantes a la de los transportadores de azúcares nos hizo concebir la idea de que la inactivación catabólica podría ser un mecanismo de regulación común a otras proteínas de membrana plasmática. Para comprobar esta hipótesis decidimos investigar el comportamiento de otra proteína de membrana, el transportador de K^+ . Este sistema de transporte es muy importante ya que el K^+ es un catión necesario para todos los organismos conocidos y participa

en numerosos procesos celulares. Presenta además la ventaja de que ha sido ampliamente estudiado en levadura.

1.2. Características del transporte de K^+ .

El K^+ se acumula en las células contra gradiente de concentración, alcanzando concentraciones hasta de 0.5 M mientras que la concentración de otros iones como Na^+ y H^+ es de tan sólo 10^{-3} y 10^{-7} M respectivamente. En levadura existe un intercambio de H^+ y K^+ . La salida de H^+ está catalizada por la H^+ -ATPasa de membrana plasmática (Serrano, 1988b) que genera un potencial eléctrico capaz de permitir a la célula la captación contra gradiente de K^+ y de otros nutrientes lo que provoca una acumulación de estas moléculas cuya concentración puede llegar a ser de hasta 1000 veces mayor en el interior que en el exterior. En este organismo se ha identificado un sistema de transporte de K^+ que tiene dos componentes con distinta afinidad. Uno con baja afinidad que presenta una K_m aparente de 2 mM, y otro de alta afinidad con una K_m aparente de 20 μ M. Este último componente aparece cuando disminuye el contenido interno de K^+ (Rodríguez-Navarro y Ramos, 1984).

La captación de K^+ en levadura está regulada. Se sabe que permanece constante cuando el pH extracelular varía entre 8 y 5.5 y que un descenso del pH intracelular por adición de ácido propiónico a pH 5.6 provoca un incremento tanto de la V_{max} como de la K_m de ambos componentes (Rodríguez-Navarro y Ramos, 1984). La velocidad máxima del transporte de K^+ también puede verse afectada por la presencia de compuestos que alteran el potencial de membrana de tal forma que una disminución de dicho potencial inhibe el transporte de K^+ (Ramos *et al*, 1990). Además en presencia de estos compuestos la célula pierde K^+ y así el contenido celular de este ión puede descender desde su valor normal, 500 nmol K^+ /mg PS, hasta tan sólo 250 nmol/mg PS (Rodríguez-Navarro y Ramos, 1984; Ramos y Rodríguez-Navarro, 1986). El efecto de una disminución del potencial de membrana sobre el transporte de K^+ también se hace patente en mutantes con baja actividad de la H^+ -ATPasa de membrana plasmática. En este caso también se observa un descenso de la V_{max} mientras permanece

constante la K_m (Ramos *et al*, 1990).

El transporte de K^+ está también regulado por mecanismos que son ajenos al cambio en el pH intracelular y a la actividad de la ATPasa. Se ha observado que el transporte de K^+ se activa durante la fermentación (Ramos *et al*, 1992). En esta activación se produce un aumento de la V_{max} de los transportes de alta y de baja afinidad por un mecanismo que es dependiente de la fosforilación del azúcar pero independiente de la vía del AMP cíclico (Alijo y Ramos, 1993).

El sistema de transporte de K^+ , además de este catión, puede transportar otros cationes, con afinidades que decrecen en el siguiente orden: $K^+ \gg Rb^+ > NH_4^+ \geq Na^+ > Li^+$ (Borst-Pauwels, 1981). Este sistema de transporte consta de al menos dos proteínas cuyos genes, *TRK1* y *TRK2*, han sido secuenciados (Gaber *et al*, 1988, Ko *et al*, 1990). El papel que desempeña cada una de estas proteínas en la acumulación de K^+ aún no está claro y para explicarlo se han planteado dos hipótesis. Una de ellas postula que Trk1p y Trk2p serían dos proteínas de membrana plasmática que llevarían a cabo el transporte de alta y baja afinidad respectivamente (Gaber *et al*, 1988, Ko *et al*, 1990). La otra hipótesis postula que el transporte de K^+ , y el resto de los cationes anteriormente citados, se llevaría a cabo a través de un sistema multimérico compuesto por un único transportador común a todos los cationes y por varias proteínas, entre las que se encontrarían Trk1p y Trk2p, que actuarían como moduladores de la afinidad del transportador (Borst-Pauwels, 1981; Ramos *et al*, 1985).

2. Papel de la PKA en la inactivación catabólica.

El hecho de que la inactivación catabólica de los transportadores de azúcares requiera la presencia de glucosa o de otro azúcar fermentable (Busturia y Lagunas, 1985; Busturia y Lagunas, 1986; DeJuan y Lagunas, 1986) así como también el hecho de estas proteínas tengan sitios de fosforilación para la proteína kinasa dependiente de cAMP (PKA) (Bisson *et al*, 1993) sugería que el cAMP podría hallarse implicado en el proceso. Se sabe que la adición de glucosa a levaduras creciendo tanto en presencia de una fuente de carbono fermentable como no fermentable produce un aumento transitorio, 1 ó 2 minutos, de los niveles de cAMP (Van der

Plaat y Van Solingen, 1974; Mazón *et al*, 1982; Eraso *et al*, 1987). Como consecuencia de este aumento se activa la cascada de reacciones que conducen a la fosforilación de numerosas proteínas por PKA (Fig. 1). Esta fosforilación modifica la actividad de dichas proteínas.

2.1. La proteína kinasa dependiente de cAMP.

La fosforilación por PKA consiste en la unión covalente de forma reversible de un resto fosfato principalmente a residuos de serina de la secuencia consenso Arg-Arg-X-Ser de las proteínas sustrato, pero existen otras secuencias que también pueden ser fosforiladas. La PKA es un tetrámero que consta de dos subunidades catalíticas (C) y dos reguladoras (R). EL cAMP activa el holoenzima uniéndose a las subunidades reguladoras, disociando el complejo en dos monómeros catalíticos activos y un dímero formado por las dos subunidades reguladoras, según la estequiometría siguiente (Krebs y Beavo, 1979):



en donde R_2C_2 es el holoenzima inactivo y C las subunidades catalíticas activas. La subunidad reguladora está codificada por un único gen, *BCY1* (Toda *et al*, 1987a), mientras que existen tres genes para las subunidades catalíticas, *TPK1*, *TPK2* y *TPK3* (Toda *et al*, 1987b). La subunidad reguladora inhibe la actividad de las subunidades catalíticas al unirse al sitio activo. Esta subunidad contiene además una secuencia que puede ser fosforilada por la subunidad catalítica. Cuando esto ocurre, disminuye la afinidad de R por C. Ninguno de los tres genes *TPK* es esencial pero al menos la presencia de uno de estos genes es necesaria para el crecimiento normal de la célula. Los productos de estos genes presentan probablemente funciones complementarias, tales como diferencias en la especificidad por el sustrato y diferentes grados de actividad PKA. La actividad PKA se halla localizada principalmente en la fracción soluble celular pero también se ha visto asociada a la membrana plasmática (Behrens y Mazón, 1988).

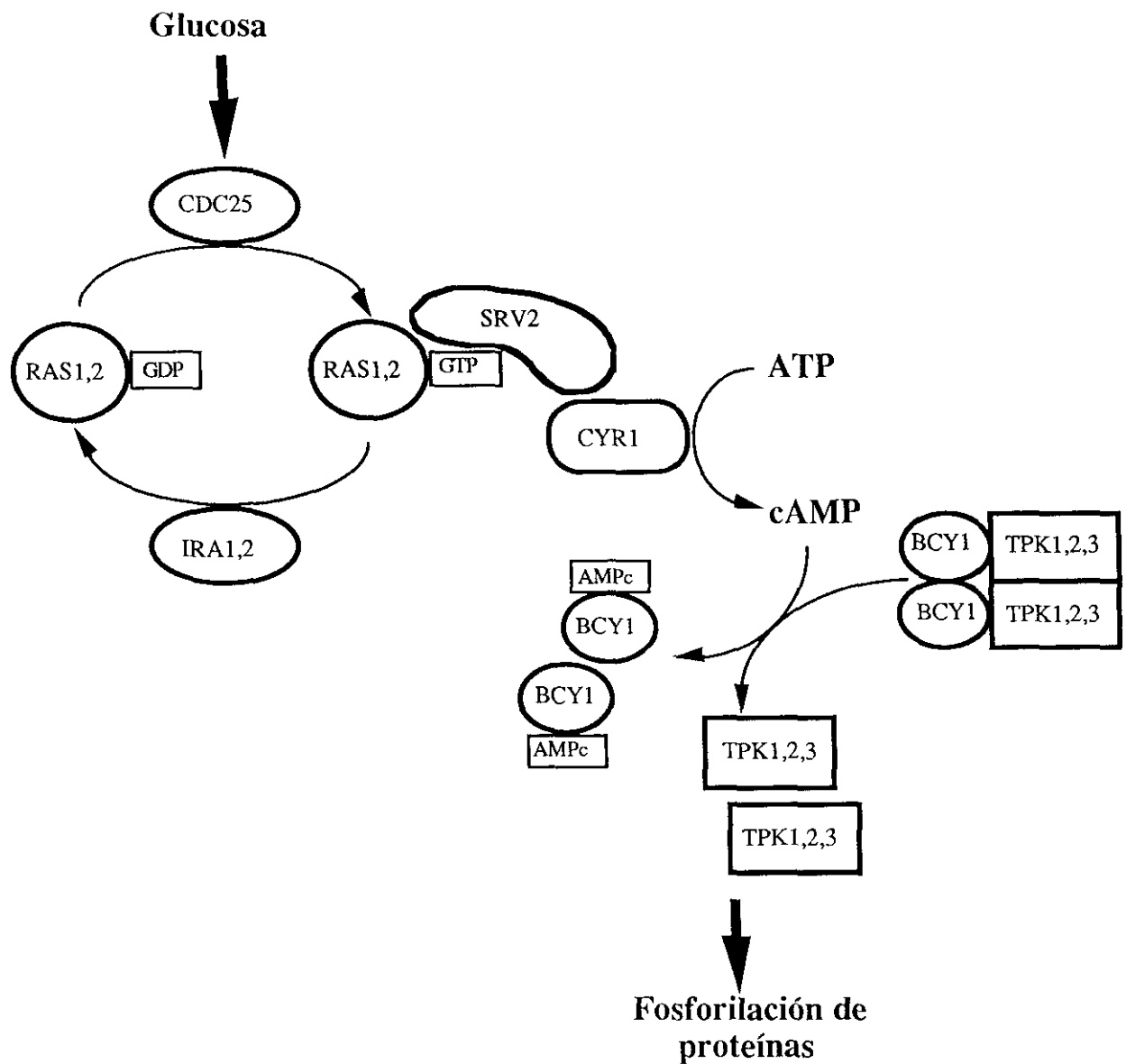


Figura 1. Esquema de la vía Ras/cAMP.

Los productos que intervienen en esta vía se indican mediante el nombre del gen que los codifica.

2.2. La PKA en la inactivación catabólica de los transportadores de azúcares.

Entre las proteínas sustrato de la actividad PKA se encuentran la fructosa-1,6-bisfosfatasa (Mazón *et al*, 1982), la trehalasa (Van der Plaats y Van Solingen, 1974), la isocitrato liasa (López-Boado *et al*, 1988), el factor de transcripción ADR1 (Cherry *et al*, 1989) y la 6-fosfofructosa-2-kinasa (François *et al*, 1984). En el caso de la fructosa-1,6-bisfosfatasa y la isocitrato liasa la fosforilación por PKA ha sido relacionada con la inactivación catabólica de estas enzimas. En un principio se postuló que dicha fosforilación provocaba un cambio conformacional en la enzima que inducía su degradación (Mazón *et al*, 1982) pero estudios posteriores sobre la inactivación catabólica de la fructosa-1,6-bisfosfatasa han mostrado que la degradación ocurre independientemente de la fosforilación (Rose *et al*, 1987).

La fosforilación por PKA también se ha relacionado con la inactivación catabólica de los transportadores de azúcares, en concreto de los sistemas de transporte de glucosa y galactosa (Ramos y Cirillo, 1989). Se ha publicado que los mutantes *bcy1*, que presentan un defecto en la subunidad reguladora y como consecuencia su actividad PKA es independiente de cAMP, presentan una baja actividad de transporte de glucosa. Además se ha publicado que estos mutantes no presentan actividad de transporte de galactosa. De estos resultados se concluyó que la presencia de la subunidad reguladora funcional es necesaria para la expresión de estos transportadores. Por otro lado, se ha publicado que un mutante *bcy1 tpk1^w*, que además de tener afectada la subunidad reguladora tiene afectadas las subunidades catalíticas, no es capaz de inactivar estos transportes (Ramos y Cirillo, 1989). De estos resultados se concluyó que la actividad PKA es necesaria para su inactivación catabólica. Dado que la eventual relación entre fosforilación e inactivación del transportador de maltosa no se había establecido nos propusimos investigar esta posibilidad. Como veremos más adelante, los resultados obtenidos nos indujeron a reexaminar los previamente descritos para los transportadores de glucosa y galactosa.

3. Mecanismos de degradación de proteínas de membrana.

Se sabe que *S. cerevisiae* contiene un gran número de proteinasas, localizadas en los distintos compartimentos celulares (Jones, 1991; Suárez Rendueles y Wolf, 1988). Además se conocen algunos de los mecanismos implicados en la degradación de las proteínas citoplasmáticas (Hershko y Ciechanover, 1992; Egner *et al*, 1993). Sin embargo, los mecanismos de degradación de proteínas de membrana plasmática son prácticamente desconocidos. Estas proteínas podrían degradarse mientras están ancladas en la propia membrana, por la acción de proteinasas específicas. Por otra parte, la degradación de proteínas de membrana también podría llevarse a cabo en el interior de la célula, tras su internalización por un proceso de endocitosis. Por medio de la endocitosis las células eucariotas captan componentes del medio extracelular mediante la formación de vesículas a partir de su membrana plasmática.

En células de eucariotas superiores la internalización parece ser un paso previo a la degradación de estas proteínas (Hare, 1990). Durante la endocitosis las proteínas, normalmente receptores, son concentradas tras unirse a sus ligandos en invaginaciones de la membrana que se hallan recubiertas en la parte interna por una red de proteínas algunas de las cuales, como las adaptinas y la clatrina, ya han sido identificadas (Schmid, 1992; Robinson, 1994). La función que llevan a cabo estas proteínas aún no está clara. Se cree que las adaptinas se unen a los residuos citoplasmáticos de las proteínas que van a internalizar, proporcionando así un sitio de unión para clatrina. En esta etapa de internalización los dominios citoplasmáticos de los receptores juegan un papel importante, a través de ciertas secuencias que actúan de señal para la internalización (Trowbridge *et al*, 1994). Finalmente las invaginaciones se cierran formando vesículas en una etapa que requiere energía y factores citosólicos. Una vez en el interior de la célula, las vesículas pierden la cubierta de proteínas y vierten su contenido al sistema de endosomas que está formado por compartimentos con pH ácido donde muchos receptores se disocian de sus ligandos (Mellman *et al*, 1986). Algunos de estos receptores libres son reciclados a la membrana plasmática y otros son degradados en el lisosoma. Por otra parte los

ligandos son transportados a su destino final en la célula (Rodman *et al*, 1990). Se han descrito casos de receptores que son endocitados de forma constitutiva, es decir en ausencia de su ligando (Trowbridge, 1991).

3.1. La endocitosis en levadura.

En levadura, la internalización de proteínas mediante endocitosis no se conoce con tanto detalle como en células de eucariotas superiores. Existen dos tipos de endocitosis: de fase fluida y mediada por receptores. En el primer caso se internaliza una porción del medio extracelular sin que ello vaya acompañado de unión alguna de un ligando a una proteína de membrana. En este caso el proceso es no saturable. Para el estudio de la endocitosis de fase fluida se suele utilizar como marcador el colorante fluorescente "lucifer yellow" (LY) (Riezman, 1985). Con menor frecuencia también se ha utilizado α -amilasa, el colorante fluorescente FITC-dextrano (Makarow, 1985a) e incluso partículas virales (Makarow, 1985b). En el caso de endocitosis mediada por receptor un ligando se une a su receptor y el complejo es internalizado. Este proceso es saturable y con él la célula puede concentrar un ligando en su interior. Como marcadores se han empleado los factores α y α , que son feromonas implicadas en la conjugación de células de diferente tipo sexual (Chvatchko *et al*, 1986; Singer y Riezman, 1990; Raths *et al*, 1993; Davis *et al*, 1993). Cada célula secreta una única feromona y expresa en su superficie un receptor para la feromona secretada por el otro tipo de células.

Todos estos marcadores han servido para estudiar la endocitosis en mutantes afectados en distintas etapas de esta vía lo que ha permitido ampliar el conocimiento de las proteínas implicadas y de los procesos en que intervienen. En la figura 2 se muestra un esquema de la vía de la endocitosis en levadura. En él se indican algunos de los genes cuyos productos se sabe son necesarios para el transcurso de la misma y la etapa en la que actúan (Riezman, 1993).

El primer paso en la endocitosis es la internalización. Cuando los factores α y α se unen a su receptor en la membrana, éste es hiperfosforilado y el complejo es internalizado. En el caso del receptor del factor α , se ha identificado una secuencia que parece ser la responsable de esta

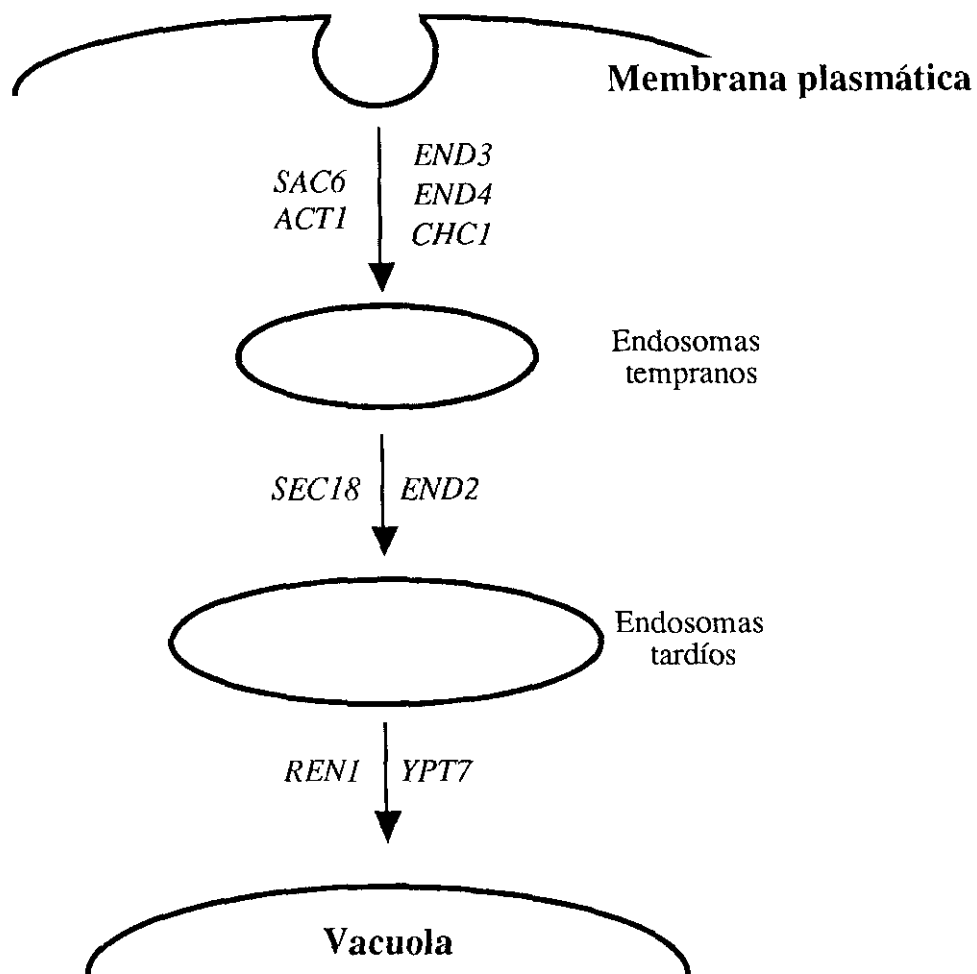


Figura 2. Vía de la endocitosis en *S. cerevisiae*.

En la figura se representa un esquema de las etapas de la endocitosis en levadura. En ella se indican algunos de los genes cuyos productos se han identificado como componentes de dicha vía.

internalización aunque su función aún no se conoce en detalle (Rohrer *et al*, 1993). Ambos receptores son también endocitados en ausencia de ligando de forma constitutiva (Davis *et al*, 1993). También en este caso el dominio citoplasmático del receptor parece intervenir en la internalización.

También en levadura se ha estudiado el papel de la clatrina en la endocitosis. Se ha visto que las cepas que llevan interrumpido el gen de su cadena pesada, *CHC1* (clatrin heavy chain), son capaces de internalizar tan sólo el 35-50% de factor α con respecto a la cepa silvestre (Payne *et al*, 1988; Riezman, 1993). Otras proteínas que participan en la formación de vesículas a partir de invaginaciones de la membrana plasmática son proteínas del citoesqueleto como la actina y la Sac6p (Kübler y Riezman, 1993). La Sac6p es una proteína homóloga a la fibrina de células de organismos superiores que se liga a la actina. La opinión actual es que existen además otras proteínas aún no identificadas que también actúan en este proceso. Así por ejemplo, se ha observado que en unos mutantes termosensibles, los mutantes *ts1* (Waltschewa *et al*, 1991; Tafrov y Venkov, 1992), la expresión de la mutación va acompañada de un aumento en la velocidad de endocitosis de fase fluida respecto a la cepa silvestre, y se ha postulado que este fenotipo se debe a la alteración de una proteína que podría estar localizada en la membrana.

Recientemente (Raths *et al*, 1993) se han aislado dos cepas mutantes, la que lleva la mutación *end3* y la que lleva la mutación *end4* que están permitiendo ampliar el conocimiento sobre el desarrollo de la endocitosis en levadura. Estos mutantes tienen afectada la primera etapa de la endocitosis, la internalización, y son termosensibles. Se ha visto que estos mutantes no internalizan el factor α y tampoco acumulan LY a la temperatura no permisiva. Por tanto, son defectivos tanto en endocitosis de fase fluida como en endocitosis mediada por receptor. En el caso de *end3* la disminución en la endocitosis aparece tanto a temperatura permisiva como no permisiva, lo que indica que la endocitosis no es esencial para la supervivencia de la célula.

Otro grupo de mutantes relacionados con la vía de la endocitosis parecen estar afectados en la fusión de endosomas tempranos y tardíos, siendo estos últimos los que a menudo liberan

su contenido a vacuola. Una de estas cepas mutantes es la que lleva la mutación *end2* (Chvatchko *et al*, 1986) que puede internalizar el factor α pero no es capaz de degradarlo. Así mismo, la fusión de endosomas parece depender del producto del gen *SEC18* que codifica una proteína homóloga a la proteína NSF (N-ethylmaleimide-sensitive fusion protein) de mamíferos. Se ha visto que esta proteína está implicada *in vivo* en el transporte de proteínas desde el retículo endoplásmico al aparato de Golgi. Así mismo, se ha visto que *in vitro* esta proteína está implicada en la fusión de vesículas endocíticas (Raths *et al*, 1993; Díaz *et al*, 1989). Consistente con esta observación es el hecho de que en las cepas con la mutación *sec18*, el factor α sea internalizado pero que, a diferencia de lo que ocurre en las cepas silvestres, no sea liberado en vacuola. En estos mutantes el factor α se acumula en endosomas tempranos (Riezman, 1993; 1985). Estos hechos indican que la proteína Sec18p no es necesaria en la etapa de internalización de la endocitosis pero sí es necesaria para que las proteínas endocitadas alcancen su destino final.

Actualmente se piensa que, al igual que en células de mamíferos, la endocitosis tiene elementos comunes con la secreción de enzimas a vacuolas. Así lo demuestra el hecho de que el producto de *REN1*, que interviene en el paso de endosomas a vacuola, sea idéntico a *VPS2* (vacuolar protein sorting), un factor necesario para la liberación de proteínas sintetizadas *de novo* a vacuola (Davis *et al*, 1993). Por otro lado, otro gen, *YPT7*, aislado por su homología con *Rab7*, que codifica una proteína que liga GTP y que se encuentra asociada a endosomas de mamíferos, también parece controlar los últimos pasos de la endocitosis y la liberación de enzimas a vacuolas. Las cepas con la mutación *ypt7* internalizan el factor α pero no lo degradan (Wichmann *et al*, 1992). Estas cepas presentan además un retraso en la maduración de las enzimas vacuolares y alteración de la morfología de la vacuola.

En este trabajo nos propusimos investigar si una internalización mediada por endocitosis está implicada en la proteólisis de los transportadores de azúcares de levadura o si por el contrario esta proteólisis ocurre mientras la proteína está anclada en la membrana plasmática. Como veremos más adelante, los resultados obtenidos sugieren fuertemente que la inactivación

requiere internalización. Por otra parte, la degradación podría llevarse a cabo bien en la vacuola, un orgánulo que se considera similar al lisosoma de eucariotas superiores debido a su alto contenido en proteinasas y su pH ácido, bien en el proteasoma, un sistema multicatalítico que se halla en el citoplasma y que se supone responsable de la degradación de proteínas que ligan ubiquitina.

3.2. La vacuola.

Se conocen varias proteinasas vacuolares, todas ellas muy inespecíficas. La mayoría de las enzimas vacuolares se sintetizan como precursores. Estos precursores alcanzan la vacuola, desde el retículo endoplásmico a través del aparato de Golgi, donde son procesados proteolíticamente a enzimas maduros y activos (Jones, 1991; Spormann *et al*, 1992; Hirsch *et al*, 1992a; Hirsch *et al*, 1992b). La maduración de enzimas vacuolares se produce por la acción de las proteinasas PrA, PrB o por autocatálisis. Además de la vía de secreción otras enzimas son captadas por la vacuola directamente desde el citoplasma por un mecanismo desconocido (Knop *et al*, 1993).

3.3. El proteasoma.

La proteólisis en el interior celular, además de en la vacuola, también puede llevarse a cabo en el citoplasma por unos complejos de proteinasas de alto peso molecular, los proteasomas. Según el coeficiente de sedimentación se conocen dos tipos de proteasomas, el 20S y el 26S. El proteasoma 20S, con un peso molecular de 700KDa, se encuentra en células eucariotas desde levaduras hasta hombre (Rivett, 1993). En levadura el proteasoma 20S se conoce como proteínasa yscE. Presenta tres actividades catalíticas distintas y que son, respectivamente, similares a tripsina, quimotripsina y peptidil-glutamil-péptido hidrolasa. Esta proteínasa es por tanto capaz de romper péptidos cuyo extremo carboxi-terminal lleve aminoácidos básicos, hidrofóbicos y ácidos, respectivamente (Heinemeyer *et al*, 1991). En levadura se han clonado y secuenciado catorce subunidades pertenecientes al proteasoma 20S

que están organizadas formando una especie de cilindro a cuyo interior deben acceder las proteínas desnaturalizadas para ser degradadas (Hilt y Wolf, 1992). El proteasoma 26S, con un peso molecular de 1500-2000 KDa, ha sido recientemente identificado en levadura (Fischer *et al*, 1994). Está formado por el proteasoma 20S, como centro catalítico, y al menos dos factores adicionales, CF1 y CF2, que forman un subcomplejo, el 19S. El proteasoma 26S parece ser responsable de la degradación de proteínas de vida media corta, degradación que puede llevarse a cabo tanto de forma dependiente como independiente de ubiquitina (Hershko y Ciechanover, 1992; Murakami *et al*, 1992).

3.4. La vía de la ubiquitina.

La ubiquitina es un péptido que está implicado en la degradación de proteínas anómalas y de proteínas de vida media corta (Rechsteiner, 1991) si bien no todas las proteínas que ligan ubiquitina se degradan rápidamente. La unión covalente a la proteína de varias moléculas de ubiquitina parece ser la señal para la degradación por esta vía. El proceso se inicia cuando la glicina carboxi-terminal de la ubiquitina es activada en presencia de ATP y forma un intermedio de alta energía al unirse por un enlace tiol-éster con un enzima activante de ubiquitina, E1. En una segunda reacción un carrier o transportador, E2 o UBC, transfiere la molécula de ubiquitina desde E1 al sustrato, que a su vez está unido a una ligasa de ubiquitina o E3. Se forma entonces un isopéptido por la unión del carboxi-terminal de la ubiquitina y el ϵ -NH₂ de una lisina del sustrato. En reacciones sucesivas, se forma una cadena de poliubiquitina mediante la transferencia de ubiquitina a la lisina 48 de la molécula de ubiquitina previamente unida a la proteína sustrato. Los enzimas E2 pueden donar la ubiquitina a proteínas específicas aunque en la mayoría de los casos sólo se produce la unión de una molécula de ubiquitina y probablemente esta unión no esté implicada en la degradación de la proteína. El reconocimiento de algunas proteínas para su degradación por esta vía está mediado por su aminoácido terminal libre (Varshavsky, 1992) aunque este grupo terminal no es la única señal de reconocimiento, ya que se han identificado otras señales en proteínas que se degradan de una forma dependiente de

ubiquitina (Ciechanover, 1994).

OBJETIVOS

OBJETIVOS

Los objetivos de este trabajo han sido:

- Establecer si el transportador de K^+ presenta una inactivación catabólica semejante a la observada en el caso de los transportadores de azúcares. Con ello pretendemos averiguar si esta inactivación es un mecanismo de control específico de los transportadores de azúcares o si por el contrario es un fenómeno común a otras proteínas de membrana plasmática.

- Establecer si, al igual que la inactivación de los transportadores de glucosa y galactosa, la inactivación catabólica del transportador de maltosa requiere actividad de la proteína kinasa dependiente de cAMP.

- Establecer si la proteólisis responsable de la inactivación catabólica tiene lugar en la propia membrana plasmática o en el interior celular tras su internalización por un proceso de endocitosis.

- Establecer si el proteasoma y/o la vacuola se hallan implicados en la inactivación catabólica.

MATERIALES Y METODOS

MATERIALES Y METODOS

1. MATERIALES.

1.1. Productos.

1.1.1. Isótopos radiactivos.

Todos los isótopos radiactivos utilizados procedían de la casa comercial Amersham.

1.1.2. Productos para la preparación de geles de SDS-poliacrilamida.

Acrilamida, de Merck.

Bis-acrilamida, de E.C. apparatus corporation.

SDS, de Merck.

Tris, de Serva.

Persulfato amónico, de Sigma.

TEMED, de Bio-Rad.

1.1.3. Tinciones.

Coomassie Brilliant Blue R-250, de Bio-Rad.

Ponceau S, de Sigma.

1.1.4. Detección inmunológica.

Anticuerpo contra el transportador de maltosa, de Gist-Brocade.

Anticuerpo secundario, cabra-anti conejo unido a fosfatasa alcalina, de Bio-Rad.

Los sustratos de la fosfatasa alcalina, NBT y BCIP, también de Bio-Rad.

El anticuerpo secundario, cabra anti-conejo conjugado a rodamina, de NORDIC Immunological lab.

Tween 20, de Sigma.

1.1.5. Inhibidores.

Azida sódica, de Sigma. Es un desacoplador de membrana de efectos reversibles.

Se emplea para disminuir el contenido de K⁺ intracelular. Es también inhibidor de la ATPasa mitocondrial.

Cicloheximida, de Sigma. Inhibidor de la síntesis de proteínas de células eucariotas.

Clorhidrato de tetraciclina, de Merrel Dow Pharmaceuticals, Inc., inhibidor del crecimiento bacteriano.

DEEB, de Sigma. Inhibidor específico de la ATPasa de membrana plasmática.

Fluoruro potásico, inhibidor de fosfatasa.

Molibdato amónico, de Carlo Erba. Inhibidor de la fosfatasa ácida.

Los siguientes inhibidores de proteasas, todos ellos de Sigma: Antipaina, IAA, PMSF, STI.

1.1.6. Otros productos.

ATP, de Sigma.

DAPI, de Sigma.

DTE, de Sigma. Agente reductor de grupos sulfidriilo.

Kemptide, de Sigma. Péptido sintético aceptor de grupos fosfato que se utiliza como sustrato de la PKA.

Lucifer yellow, sal de litio, de Sigma.

Marcadores de pesos moleculares sin preteñir, de Bio-Rad y preteñidos, de Sigma.

Los demás productos utilizados eran de grado analítico.

1.2. Equipo instrumental.

Los aparatos utilizados en la realización de este trabajo han sido los normales en un laboratorio de microbiología. La marca y modelo de algunos de ellos se indican en el apartado de Métodos, cuando se describe la técnica en que fueron utilizados.

1.3. Medios de cultivo.

Los medios de cultivo se esterilizaban en autoclave, en atmósfera de sobrepresión a 121°C durante 20 minutos. El agua empleada era destilada. A los medios sólidos se les añadía agar-agar a una concentración de 1.5%. En los casos en que era necesario se suplementaba con los requerimientos auxotróficos de cada cepa a las concentraciones descritas por Sherman *et al.* (1983).

1.3.1. Medios para *S. cerevisiae*.

1.3.1.1. Medio mínimo sintético.

Cada litro de este medio contiene $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 3.4 g; KH_2PO_4 0.2 g; H_3PO_4 al 85% 1.7 ml; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.25 g; KCl 9 mg; NaCl 0.25 g; CuSO_4 0.1 mg; $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 1 mg; ZnSO_4 1.8 mg; Biotina 0.02 g; ácido pantoténico 0.5 mg; inositol 10 mg; tiamina 4 mg; piridoxina 1 mg. Las vitaminas se esterilizaron por filtración a través de un filtro Renner GmbH, de 0.2 μm de tamaño de poro. El pH del medio que contiene las sales y los oligoelementos se ajusta a 6 con KOH. Una vez estéril y atemperado se añade la fuente de carbono, estéril, y las vitaminas.

1.3.1.2. Medio Winge.

Contiene extracto de levadura, al 0.3% y glucosa, al 2%.

1.3.1.3. Medio YNBw.

Se preparó con el medio Bacto Yeast Nitrogen Base, sin aminoácidos, al 0.67%. Es un medio nitrogenado, que contiene las sales y vitaminas necesarias para el crecimiento. El aporte nitrogenado era $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. La fuente de carbono era la necesaria en cada caso.

1.3.1.4. Medio YP, con fuente de carbono.

Es un medio rico que se prepara a partir de 1% de extracto de levadura y 2% de peptona. La fuente de carbono, al 2%, podía ser glucosa, maltosa o galactosa.

1.3.1.5. Medio para la inhibición de la síntesis de proteínas: Medio mínimo sintético sin amonio.

La composición es la misma que la del medio mínimo sintético a excepción de que se sustituye el $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ por K_2HPO_4 y el $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ por FeCl_2 . En la preparación de este medio se utilizaba agua MilliQ.

1.3.2. Medios para *E. coli*.

LB (Luria-Bertani) con Ampicilina.

Se compone de Bacto-triptona 10 g/l, extracto de levadura 5 g/l y NaCl 10 g/l. El pH se

ajustaba a 7.5 con NaOH 0.1 M. Después de esterilizarlo se añadía ampicilina a concentración 50 µg/ml.

1.4. Material biológico.

1.4.1. Cepas de *S. cerevisiae*.

En la Tabla 1 se describe el genotipo y la procedencia de las cepas usadas en este trabajo.

1.4.2. Cepa de *E. coli*.

DH5α, descrita en Sambrook *et al.* (1989) con el siguiente genotipo:

supE44 Δlac U169 (F80 lac ZDM15) hsd R17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1.

1.4.3. Plásmido.

pRM1.1, plásmido multicopia que lleva el locus *MALI*, descrito por Rodicio (1986).

Tabla 1. Cepas de *S. cerevisiae* empleadas en este trabajo.

Cepa	Genotipo	Procedencia/Referencia
ATCC 42407	<i>MATa suc⁻</i>	D. Hawthorne (Seattle)
RS-514	{ <i>MATa ade1-100 his4-519 ura3-52 leu2-3,112 (gal1::PMA1)</i> }	Vallejo y Serrano, 1989
RS-515	{Isogénica con RS-514} <i>pma1-204</i>	"
RS-516	{Isogénica con RS-514} <i>pma1-205</i>	"
W-303-1A	{ <i>MATa ade2-1 his3-11,15 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1 can1-100</i> } <i>TPK1 TPK2 TPK3 BCY1</i>	Thomas y Rothstein, 1989
MB-23	{Isogénica con W-303-1A} <i>TPK1 tpk2::HIS3 tpk3::URA3 BCY1</i>	Mazón <i>et al.</i> , 1993
MB-13	{Isogénica con W-303-1A} <i>tpk1::LEU2 TPK2 tpk3::URA3 BCY1</i>	"
MB-12	{Isogénica con W-303-1A} <i>tpk1::LEU2 tpk2::HIS3 TPK3 BCY1</i>	"
238	{ <i>MATa ade? leu2 ura3-52 his3 trp1 CTT1::lacZ</i> } <i>TPK1 TPK2 TPK3 BCY1</i>	K. Tatchell
242	{Isogénica con 238} <i>TPK1 tpk2::HIS3 tpk3::TRP1 bcy1::LEU2</i>	"
243	{Isogénica con 238} <i>tpk1^w tpk2::HIS3 tpk3::TRP1 bcy1::LEU2</i>	"
288U	{ <i>MATα gal2 mal⁻ ura3</i> }	Waltschewa <i>et al.</i> , 1991
54P	{Isogénica con 288U} <i>ts1</i>	"
H17	<i>MATα leu2 ura3 ts1</i>	P. Venkov (Soffa)
TY17	<i>MATα leu2 URA3 TS1</i>	"
RH 144-3D	<i>MATa ura3 leu2 his4 bar1-1 END3 END4</i>	Raths <i>et al.</i> , 1993
RH 266-1D	{Isogénica con RH 144-3D} <i>end3</i>	"
RH 268-1C	{Isogénica con RH 144-3D} <i>end4</i>	"
WCG4a	<i>MATa his3-11,15 leu2-3,112 GAL⁺ ura3 can^s</i>	Heinemeyer <i>et al.</i> , 1991
WCG4-11a	{Isogénica con WCG4-11a} <i>pre1-1</i>	"
WCG4-21a	{Isogénica con WCG4-11a} <i>pre2-1</i>	Heinemeyer <i>et al.</i> , 1993
WCG4-11/21a	{Isogénica con WCG4-11a} <i>pre1-1 pre2-1</i>	"
YMTA	<i>MATa his3-11,15 leu2-3,112 ura3-Δ5 can^s pral::HIS3</i>	Teichert <i>et al.</i> , 1989
YMTAB	<i>ura3-Δ5 his3-11,15 leu2-3,112 pral::HIS3 prb1ΔAV</i>	"

2. METODOS.

2.1. Condiciones de cultivo.

2.1.1. Conservación.

Las cepas se conservaban a -70°C suspendidas en glicerol al 15% (p/v). Cuando se requería, a partir de esta suspensión congelada se obtenía masa celular con un asa de siembra estéril y se extendía en medio sólido para aislar colonias.

2.1.2. Cultivo.

2.1.2.1. En medio sólido.

Para comprobar el fenotipo, se suspendían 4 ó 5 colonias aisladas previamente en 200 μl de agua estéril cada una. Se depositaban 5 ó 10 μl de cada una de estas suspensiones en placas petri que contienen el medio y los requerimientos auxotróficos y la fuente de carbono necesarios en cada caso. Las placas se incubaban durante unas 48 horas a la temperatura indicada.

Una vez que nos asegurábamos de que el fenotipo que presentan las cepas era el correcto, de la masa celular obtenida extendíamos un poco en placas nuevas para conseguir más masa celular para congelar las cepas.

2.1.2.2. En medio líquido.

2.1.2.2.1. Preparación de los inóculos.

Con un asa de siembra estéril se cogía una porción de la masa celular obtenida en placa como se indica en el apartado anterior, y se inoculaba con ella medio de cultivo líquido que se incubaba a la temperatura indicada con agitación (200-250 rpm) hasta llegar a crecimiento estacionario.

2.1.2.2.2. Preparación de los cultivos.

Los matraces conteniendo aproximadamente una quinta parte de su volumen con los medios indicados en cada caso se inoculaban con una alícuota de inóculo. Se agitaban a 200-250 rpm a la temperatura indicada durante toda la noche.

2.1.3. Determinación del crecimiento.

El crecimiento celular se determinaba midiendo la turbidez de los cultivos a 640 nm en un espectrofotómetro Hitachi 100-10. Mediante curvas de calibrado previamente realizadas se estableció que 1 ml de cultivo de 1 DO contiene 0.29 mg de proteína. Para detectar posibles contaminaciones bacterianas se examinaban los cultivos al microscopio óptico.

2.2. Condiciones de inactivación.

Para inactivar las proteínas de membrana plasmática objeto de este estudio, se inhibía la síntesis de proteínas. Para ello en unos casos se añadía el antibiótico cicloheximida y en otros se ayunaba las células de fuente de nitrógeno, mediante suspensión en un medio mínimo cuya composición se ha descrito previamente en Materiales 1.3.1.5. (Lagunas *et al.*, 1982).

Células creciendo en fase exponencial se centrifugaban a 5000 rpm, en centrífuga Wifug 2000S durante 3 minutos aproximadamente. Se lavaban con agua destilada, cuando se iba a inhibir la síntesis de proteínas con cicloheximida, o agua MilliQ, cuando se inhibía dicha síntesis por ausencia de fuente de nitrógeno. Las células lavadas se resuspendían en un volumen 3 veces superior al volumen inicial de cultivo, para evitar que se agotasen los nutrientes durante el experimento. La cicloheximida se añadía a una concentración final de 10 $\mu\text{g/ml}$. En ambos casos se incubaba con agitación a 200-250 rpm a la temperatura indicada en cada caso. Para evitar contaminaciones bacterianas se añadía clorhidrato de tetraciclina a una concentración final de 250 $\mu\text{g/ml}$ aproximadamente.

2.3. Medida de los transportes.

2.3.1. Transportes de azúcares.

2.3.1.1. Transporte de glucosa.

Se utilizó D-(U- ^{14}C)xilosa como sustrato siguiendo el método descrito por Serrano y DelaFuente (1974). Volúmenes de cultivo correspondientes a 5 mg de proteína se recogían por centrifugación a 5000 rpm en centrífuga Wifug 2000S durante 5 minutos. Las células se

lavaban con 10 ml de KH_2PO_4 50 mM pH 6 y se resuspendían en 0.25 ml del mismo tampón a una concentración de 20 mg de proteína por ml. Este lavado permitía eliminar el azúcar del medio para evitar que interfiriera en la medida. La suspensión resultante se mantenía en un baño a 30°C durante 3 minutos aproximadamente. Una alícuota de la suspensión, 0.05 ml, equivalente a 1 mg de proteína, se depositaba en un tubo cónico atemperado a 30°C. La medida del transporte se iniciaba por la adición de xilosa radiactiva (25 $\mu\text{Ci}/\text{mmol}$) a una concentración final de 200 mM. Transcurrido un minuto de incubación a 30°C con agitación la reacción se paraba añadiendo 5 ml de agua a 4°C. Se centrifugaba un minuto a 5000 rpm en centrífuga de mesa (Wifug, modelo Doctor), se decantaba el sobrenadante y se añadían 5 ml de agua fría para resuspender las células. Las levaduras se recogían por filtración sobre filtros de fibra de vidrio (Whatman GF/C) y se lavaban sobre dicho filtro con 5 ml de agua a 4°C. Los filtros se secaban bajo una lámpara de rayos infrarrojos y se introducían en viales con 3 ml de líquido de centelleo. La radiactividad se medía en el contador de centelleo durante un minuto.

Para medir la adsorción inespecífica de la xilosa se suspendía una alícuota de células como la indicada anteriormente en 2 ml de agua. Se calentaba a baño maría durante 5 minutos, se enfriaba en hielo, se completaba el volumen hasta 5 ml de agua fría y se añadía la xilosa radiactiva. La suspensión se filtraba inmediatamente y se seguía el mismo tratamiento que en la medida del transporte. Los valores obtenidos se restaban de los respectivos valores de transporte. La correspondencia entre concentración de xilosa y radiactividad se calculaba a partir de una dilución de la solución original depositando una alícuota de la misma sobre un filtro húmedo.

2.3.1.2. Transporte de galactosa.

Se empleó la técnica descrita por DeJuan y Lagunas (1986). Un volumen de suspensión de levadura equivalente a 4 mg de proteína se recogía por centrifugación a 5000 rpm en centrífuga Wifug 2000S durante 5 minutos. Las células se lavaban con KH_2PO_4 50 mM pH 6 y se resuspendían en el mismo tampón para una concentración de 8 mg/ml. A una alícuota de la suspensión de 0.4 mg de proteína se le añadía galactosa radiactiva (0.24 $\mu\text{Ci}/\mu\text{mol}$) a

concentración 5 mM. El transporte se detenía, tras 15 segundos de incubación a 20°C con agitación, mediante la adición de 10 ml de agua a 4°C. Se filtraba inmediatamente sobre un filtro de fibra de vidrio y las células se lavaban sobre el filtro mediante filtración de 10 ml de agua fría. El filtro se sumergía rápidamente en un vial con 3 ml de líquido de centelleo y la radiactividad se medía transcurridos al menos 30 minutos.

El valor de la radiactividad adsorbida inespecíficamente y la relación entre concentración y radiactividad se medía como en el caso anterior.

2.3.1.3. Transporte de maltosa.

Se siguió el método descrito por Serrano (1977). Un volumen de cultivo correspondiente a 10 mg de proteína se filtraba sobre filtros Millipore. Las células se lavaban con 10 ml de ácido tartárico 0.1 M pH 4.2 y se resuspendían en 0.5 ml del mismo tampón en un tubo cónico. La suspensión se incubaba a 20°C durante 3 minutos. Alícuotas de esta suspensión de 0.05 ml de volumen, correspondientes a 1 mg de proteína se depositaban en tubos cónicos y el transporte se iniciaba al añadir maltosa radiactiva (0.5 $\mu\text{Ci}/\mu\text{mol}$) para una concentración final de 4 mM. Transcurridos 15 segundos de incubación a 20°C con agitación, la reacción se detenía al añadir 10 ml de agua a 4°C. La suspensión se filtraba inmediatamente sobre filtros de fibra de vidrio y las células se lavaban sobre el filtro con otros 10 ml de agua. Estos filtros se colocaban rápidamente en viales que contenían 3 ml de líquido de centelleo. La radiactividad se contaba al cabo de 30 minutos en el contador de centelleo durante un minuto.

La radiactividad adsorbida inespecíficamente y la relación entre concentración de maltosa y radiactividad se medía como en los casos anteriores.

2.3.2. Transporte de K^+ .

2.3.2.1. Tratamiento de las células.

Se siguió el método descrito por Rodríguez-Navarro y Ramos (1984) utilizando Rb^+ como sustrato. Este catión se emplea en la medida del transporte de K^+ por ser un análogo del K^+ . Una alícuota del cultivo de levadura a ensayar, conteniendo aproximadamente 3 mg de

proteína, se centrifugaba a 5000 rpm en centrífuga Wifug 2000S durante 5 minutos. Las células así obtenidas se lavaban con 5 ml de tampón que contenía MES 10 mM pH 6 y $MgCl_2$ 0.1 mM, se centrifugaban a 5000 rpm durante 1 minuto y se resuspendían en el mismo tampón (4.9 ml) al que se añadía azida sódica a concentración final 10 mM. Esta suspensión se incubaba durante 7 minutos a 30°C y con agitación. Con este tratamiento se reducía el contenido de K^+ intracelular al favorecer su salida al medio. A continuación se centrifugaba la suspensión y se lavaban las células con 5 ml del tampón descrito anteriormente. Se volvía a centrifugar y se resuspendían las células en el mismo tampón (4.75 ml) al que se añadía glucosa a concentración final 2% y se incubaban 5 minutos a 30°C. Con este tratamiento las células recuperan su nivel energético normal y con ello su capacidad de transportar K^+ .

2.3.2.2. Medida del transporte.

A la suspensión de levadura obtenida se añadía $RbCl$ para una concentración final de 5 mM y se tomaban sucesivamente, y tan rápidamente como fuese posible, 4 alícuotas cuyo volumen era el correspondiente a 0.5 ó 1 mg PS de células que se correspondían respectivamente con 0.3 y 0.6 mg de proteína. Las alícuotas, que se alternaban empezando por la de mayor contenido en células, se filtraban inmediatamente a través de un filtro de nitrocelulosa (Millipore 0.8 μm de tamaño de poro y 2.5 cm de diámetro de filtro) colocado en una unidad de filtración conectada a una bomba a vacío. Las células recogidas se lavaban 2 veces con 5 ml de $MgCl_2$ 20 mM. Se retiraba el filtro con las células rápidamente y se depositaba sobre la chimenea de la unidad de filtración. Se colocaba un nuevo filtro en la unidad de filtración y las células se arrastraban desde el filtro al fondo de la unidad con aproximadamente 2 ml de $MgCl_2$ utilizando una pipeta Pasteur. Se filtraba en vacío y se lavaban las células dos veces con 5 ml de $MgCl_2$ 20 mM. El filtro conteniendo las células se retiraba y se depositaba en la boca de un tubo de plástico donde se dejaba hasta que se terminaba con las 4 alícuotas correspondientes a la muestra.

En ese momento se depositaba el filtro en el fondo del tubo y se añadían 3 ml de HCl 0.1 M. Se agitaba, se tapaba el tubo y se mantenía a temperatura ambiente o a 4°C hasta su medida

que podía realizarse incluso 2 ó 3 días más tarde. Tras centrifugar a 5000 rpm en centrífuga de mesa el Rb^+ se medía en el sobrenadante por espectroscopía de absorción atómica a una longitud de onda de 780 nm (espectrofotómetro Perkim Elmer, modelo 2380).

En todos los experimentos una alícuota de células se sometía a todos los tratamientos excepto a la incubación con RbCl . Así se detectaba la cantidad de Rb^+ presente en las células o contaminando las soluciones utilizadas.

2.4. Medida cualitativa de endocitosis.

El procedimiento se basa en la capacidad de la levadura de internalizar el colorante fluorescente LY por un proceso endocítico. Este colorante permite la medida semicuantitativa de la endocitosis. Para realizar esta medida seguimos el método descrito por Dulic *et al.* (1991). Un volumen de suspensión de levaduras equivalente a 1.5 mg de proteína se centrifugaba en centrífuga de mesa y resuspendía en 2 ml de medio fresco YP con glucosa al 2%. 90 μl de esta suspensión se transferían a un tubo al que se añadían 10 μl de colorante para una concentración final de 4 mg/ml. Los cultivos se incubaban a la temperatura que se indica en cada experimento, durante 90 minutos. Tras la incubación, las células se transferían a un tubo Eppendorf, se centrifugaban a 3000 rpm durante 1 minuto en centrífuga Eppendorf 54145, y tras eliminar el sobrenadante, se lavaban 3 veces con 1 ml de tampón frío compuesto por succinato 50 mM pH 5.0 y azida 20 mM y se resuspendían en 10 μl de este mismo tampón. Un volumen de la suspensión de 3 ó 4 μl se mezclaba en un porta con 20 μl de agarosa de bajo punto de fusión 1.6%, a 45°C. Las preparaciones así obtenidas se guardaban en frío y oscuridad hasta el momento de su observación al microscopio. La observación se realizaba en un microscopio Zeiss Axiophot utilizando el filtro 450-490 nm, FT 510, LP 520 y una película fotográfica de 400 ASA de sensibilidad para las fotografías de contraste de fases y de 1600 ASA para las fotografías de fluorescencia. En este último caso, el tiempo de exposición fue de unos 30 segundos cuando se usó el objetivo de 40 aumentos y de 50 segundos cuando se usó el de 60 aumentos.

2.5. Obtención de fracciones celulares.

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

2.5.1. Soluciones empleadas.

*Tampón de rotura de células.

Tris-HCl 50 mM pH 8.5

EDTA 5 mM

DTE 2 mM

*Solución de lavado de bolas de vidrio.

Tris-HCl 50 mM pH 8.0

EDTA 0.5 mM

DTE 0.5 mM

*Solución de mantenimiento, GTED.

Glicerol 20%

Tricina-Tris 10 mM pH 7.5

EDTA 0.1 mM

DTE 0.1 mM

*PMSF 0.1 M, en etanol y conservado a -20°C.

*Solución de sacarosa al 53.5%.

Sacarosa al 53.5%

Tricina-Tris 10 mM pH 7.5

EDTA 0.1 mM

DTE 0.1 mM

*Solución de sacarosa al 43.5%.

Sacarosa al 43.5%

Tricina-Tris 10 mM pH 7.5

EDTA 0.1 mM

DTE 0.1 mM

En ambos casos la concentración de sacarosa se ajustaba utilizando un refractómetro de marca comercial Atago.

2.5.2. Extracto crudo.

Cantidades de levadura correspondientes a 100 mg de proteína se suspendían en tubos de

plástico de 50 ml, se les añadían 8 ml de bolas de vidrio previamente enfriadas y 4 ml de tampón de rotura, en presencia de PMSF 1 mM. Se agitaba en vórtex enérgicamente durante un minuto y se dejaba enfriar en hielo durante otro minuto. Esta operación se repetía 4 veces más.

Se recogía el sobrenadante y las bolas se lavaban 3 veces con 4 ml de la solución de lavado en presencia de PMSF 1 mM. Se recogían los líquidos de lavado que se reunían con el sobrenadante y se centrifugaban a 3000 rpm en centrífuga Beckman J2-21 con el rotor JA-20 durante 10 minutos. El sobrenadante obtenido constituía lo que denominamos extracto crudo celular. Este extracto se conservaba a -70°C hasta su análisis.

2.5.3. Fracción cruda de membrana.

El extracto crudo celular se sometía a centrifugación a 30000 rpm en ultracentrífuga Beckman L8-70M durante 30 minutos en rotor 60Ti y al sedimento obtenido se le añadía 3 ml de solución GTED y PMSF para 1 mM de concentración final. El sedimento se resuspendía en un homogeneizador de vidrio previamente enfriado y la suspensión resultante constituía lo que denominamos fracción cruda de membranas. Se conservaba a -70°C hasta su uso.

2.5.4. Fracción purificada de membrana plasmática.

La fracción cruda se aplicaba sobre un gradiente discontinuo de sacarosa. Este gradiente se preparaba en un tubo del rotor SW60. Para ello se depositaban 0.7 ml de la solución de sacarosa del 53.5% y se añadían lentamente dejándolo caer por las paredes 1.4 ml de la solución del 43.5% de sacarosa. Se centrifugaba a 55000 rpm en ultracentrífuga Beckman L8-70M durante 3 horas a 4°C que se dejaba parar sin freno y posteriormente se recogía la banda que corresponde a la interfase entre las sacarosas de distinta concentración y que contiene fundamentalmente la membrana plasmática. Se diluía con 3 volúmenes de agua fría, se mezclaba y se centrifugaba a 40000 rpm en el rotor 50Ti 30 minutos. El sedimento obtenido se resuspendía en 0.750 ml de GTED y PMSF a 1 mM y se homogeneizaba. Se conservaba a -70°C hasta su uso.

2.6. Valoración de actividades enzimáticas.

2.6.1. H⁺-ATPasa.

2.6.1.1. Tratamiento de las células para la valoración de la enzima activada por fermentación.

Una alícuota del cultivo de levaduras conteniendo 12 mg de proteína aproximadamente se centrifugaba a 5000 rpm en Wifug 2000S durante 5 minutos. Las células se resuspendían en 2 ml de glucosa al 2% en tubos Falcon y se incubaban durante 7 minutos a 30°C. Se sumergían los tubos en nitrógeno líquido y se guardaban a -70°C hasta su análisis.

2.6.1.2. Valoración de la actividad ATPasa.

Se utilizó el método descrito por Serrano (1983, 1988a) que se basa en la medida del fosfato inorgánico liberado a partir de ATP tras la incubación de este nucleótido en presencia de la muestra a ensayar.

2.6.1.2.1. Soluciones empleadas.

*Tampón de valoración de ATPasa

MES-Tris 50 mM pH 6.5.

MgSO₄ 5 mM. El catión Mg²⁺ es necesario para la actividad ATPasa.

KCl 50 mM.

Azida sódica 5 mM.

Molibdato amónico 0.2 mM.

*DEEB 20 mM.

*ATP 0.1 M, sustrato de la ATPasa.

*Solución de parada de la reacción.

Molibdato amónico 1% (p/v)

H₂SO₄ 4% (v/v)

SDS 1% (p/v)

*Acido ascórbico 10%, como agente reductor, para desarrollar color.

*K₂HPO₄ 10 mM, para la curva de calibración.

2.6.1.2.2. Procedimiento.

Dos alícuotas de la muestra problema, extracto crudo o fracción de membrana cruda, conteniendo la cantidad de proteína indicada en cada experimento, se añadían respectivamente a

dos tubos conteniendo 0.5 ml del tampón de valoración con y sin 0.2 mM DEEB. La mezcla se incubaba durante 5 minutos a 30°C y transcurrido este tiempo se iniciaba la reacción añadiendo ATP a una concentración final de 2 mM. Tras incubar 10 minutos a 30°C se detenía la reacción añadiendo 0.5 ml de la solución de parada. Se añadía 0.01 ml de ácido ascórbico, se incubaba durante 5 minutos a 30°C y se leía la absorbancia a 750 nm. La actividad ATPasa de la membrana plasmática se calculaba a partir de la diferencia de absorbancia obtenida en ausencia y en presencia de DEEB y comparando este valor con los valores obtenidos utilizando la solución patrón de K_2HPO_4 , entre 0.05 y 0.4 μ mol de fosfato.

2.6.2. Proteína kinasa dependiente de cAMP.

2.6.2.1. Soluciones empleadas.

*Tampón de extracción con inhibidores de proteasas.

Mes/NaOH 25 mM pH 6.5

EDTA 1 mM

EGTA 1 mM

STI 0.1 mg/ml

IAA 10 mM

Antipaina 0.01 mg/ml

Mercaptoetanol 20 mM

*Tampón de valoración.

Hepes 80 mM

MgCl₂ 40 mM

ATP 0.4 mM

BSA 0.4 mg/ml

γ ATP³² 20 μ Ci/ml

2.6.2.2. Obtención del extracto crudo celular.

Volúmenes de un cultivo de levadura correspondientes a 25 mg de proteína se centrifugaban a 5000 rpm en Wifug 2000S durante 3 minutos. Las células se lavaban con agua MilliQ y se les añadían 0.75 ml del tampón de extracción descrito en el apartado anterior, PMSF a concentración final 1 mM y 0.75 ml de bolas de vidrio para romper las células como

se ha descrito en Métodos 2.5.2. Tras recoger el sobrenadante se centrifugaba en frío durante 10 minutos a 10000 rpm en Eppendorf y el sobrenadante obtenido se recogía y se precipitaba con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ a una concentración final del 70%. Para ello se añadían poco a poco, en frío y con agitación 472 mg de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ por ml de sobrenadante. Se mantenía en frío durante 1 hora y se centrifugaba en frío a 10000 rpm en centrífuga Eppendorf 10 minutos. El sobrenadante se eliminaba exhaustivamente y el precipitado se resuspendía en 100 μl de tampón de extracción conteniendo inhibidores de proteasas y PMSF 1 mM concentración final. De esta suspensión se tomaba una alícuota para medir proteínas según Métodos 2.7.2.

2.6.2.3. Valoración de la actividad.

Seguimos el método descrito por Roskoski (1983) que se basa en la capacidad que tiene la PKA presente en un extracto celular de fosforilar un sustrato exógeno. La actividad proteína kinasa se midió empleando como sustrato el péptido sintético Kemptide. La mezcla de reacción llevaba 12.5 μl del tampón de valoración descrito anteriormente, fluoruro potásico (KF) 12 mM, Kemptide 0.2 mM y un volumen de extracto celular correspondiente a 10 μg de proteína. Se completaba el volumen hasta 50 μl con agua. La valoración se hacía por duplicado y en presencia y ausencia de 10 μM de cAMP. La reacción se iniciaba añadiendo el extracto. Transcurridos 5 minutos a 37°C, se detenía al depositar 40 μl de la suspensión sobre papel Whatman P-81. Los papeles con las muestras se lavaban 4 veces, sumergiéndolos en un volumen de 20 ml de ácido fosfórico 75 mM por cada papel. Se secaban y se introducían en viales que contenían 3 ml de líquido de centelleo y se medía la radiactividad durante 1 minuto.

La adsorción inespecífica de ATP radiactivo se medía a partir de una alícuota del tampón de valoración y KF 12 mM que se depositaba sobre el papel Whatman P-81 y que se trataba como las muestras. La relación entre concentración y radiactividad se obtenía a partir de 5 μl de la mezcla de tampón de valoración y KF 12 mM depositada sobre el papel P-81. En este caso no se lavaba el papel con ácido fosfórico.

2.7. Determinación del contenido de proteína.

2.7.1. Método de Lowry.

La valoración del contenido de proteína se realizaba, en general, por el método de Lowry previa precipitación con TCA. Para ello, se tomaban alícuotas de las suspensiones a ensayar, normalmente de 50 μ l, a las que se añadía TCA a una concentración final del 5% y se completaba el volumen con agua hasta 1 ml. Se dejaba precipitar a temperatura ambiente durante 20 minutos. Transcurrido este tiempo se centrifugaba 5 minutos a 10000 rpm en Eppendorf. El sobrenadante se eliminaba exhaustivamente y se disolvía el precipitado en NaOH 2 N. Si era necesario se calentaba al baño maría. Posteriormente y para tener la concentración de NaOH deseada para la valoración de proteínas se diluían las muestras a la mitad. Para calcular la concentración de proteína se empleaba una solución patrón de BSA (1 mg/ml) que se trataba igual, y en paralelo, que las muestras.

Una vez disuelta la proteína se valoraba por el método de Lowry *et al.* (1951). En todos los casos se tenía en cuenta la cantidad de NaOH presente en las alícuotas ensayadas y, con el fin de que la concentración final de este reactivo fuese exactamente la aconsejada, se igualaban todas las muestras al mismo volumen con una solución de NaOH 1N. Estas alícuotas se incubaban 10 minutos a 30°C con 2 ml de un reactivo que llevaba carbonato sódico anhidro 2%, tartrato sódico 0.02% y sulfato cúprico 0.01%. A continuación se añadían 0.2 ml de reactivo Folin. Al cabo de 30 minutos de incubación se leía su absorbancia a 660 nm.

2.7.2. Método de Bradford.

Ocasionalmente se valoró el contenido de proteína por el método de Bradford (1976) que se basa en el cambio diferencial de color que experimenta el colorante azul Coomassie en respuesta a la concentración de proteína presente en la solución.

A 1 ml del reactivo de Bradford se añadían cantidades crecientes de muestra, correspondientes a una cantidad de proteína entre 1 y 10 mg/ml. Una vez desarrollado el color, pasados 5 minutos aproximadamente, se leía su absorbancia a 595 nm en el espectrofotómetro.

La curva de calibración se hacía con BSA 0.2 mg/ml.

2.8. Métodos inmunológicos.

2.8.1. Electroforesis en geles de poliacrilamida.

2.8.1.1. Soluciones empleadas.

*Solución de acrilamida y bisacrilamida. Se preparaba disolviéndola en agua y filtrándola a través de filtros de nitrocelulosa de 0.45 μm de tamaño de poro. Se manejaba siempre con guantes. Se mantenía congelada a -20°C .

Acrilamida 38%

Bisacrilamida 2%

*Tampón de separación. Se preparaba concentrado dos veces, se guardaba estéril a 4°C y se usaba a la siguiente concentración:

Tris-HCl 0.375 M pH 8.8

SDS 0.1%

*Tampón de empaquetamiento. Se preparaba concentrado dos veces, se mantenía estéril a 4°C y se usaba a la siguiente concentración:

Tris-HCl 0.125M pH 6.8

SDS 0.1%

*Persulfato amónico 10% (p/v). Se preparaba en el momento de usarlo.

*TEMED 6.6 M. Se guardaba a 4°C .

*Solución de Laemmli. Se guardaba congelada a -20°C .

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

*Tampón de electroforesis. Se preparaba concentrado 10 veces, se mantenía a 4°C estéril y se usaba a la siguiente concentración:

Glicina 0.19 M

Tris-base 25 mM pH 8.3

SDS 0.1%

2.8.1.2. Preparación de los geles.

El método empleado se basa en el descrito por Laemmli (1970). Hemos empleado geles

de 1 mm de espesor preparados entre dos placas de cristal. El tamaño de estas placas era de 9.5x9 cm, 11x12 cm o 16x16 cm. Antes de montar el sistema, las placas se limpiaban con etanol para eliminar posibles restos de acrilamida o grasa. Los laterales se sellaban con tiras de teflón y la base con una tira de papel Whatman 3MM doblada, con un ancho final de aproximadamente 1 cm. Todo ello se sujetaba con pinzas. En el caso de placas de 9.5x9 cm, un gel separador del 10% de acrilamida se preparaba con 1.875 ml de la solución de acrilamida/bisacrilamida, 3.75 ml del tampón de separación, 1.725 ml de agua y 0.075 ml de persulfato amónico al 10%. Para sellar bien la base de las placas, se tomaban 0.75 ml de esta solución, se añadían 7 µl de TEMED y se vertían rápidamente entre las dos placas. Se dejaba polimerizar unos 5 minutos. Transcurrido este tiempo se añadían 6.75 µl de TEMED al resto de la mezcla, y ésta se vertía entre las placas, y se cubría con isobutanol saturado con agua, para obtener una superficie lisa y sin burbujas en el gel. Transcurridos unos 30 minutos se retiraba el isobutanol, se lavaba con abundante agua al grifo, y se eliminaba el agua utilizando papel de filtro.

A continuación se preparaba el gel concentrador, que en el caso de las placas de 9.5x9 cm contenía 0.225 ml de la solución de acrilamida/bisacrilamida, 1.5 ml del tampón de empaquetamiento, 1.21 ml de agua, 0.03 ml de persulfato amónico al 10% y 3 µl de TEMED. Esta mezcla se depositaba entre las placas de vidrio sobre el gel separador y se introducía un peine de teflón, con pocillos de aproximadamente 4x1 mm de base. El gel se dejaba polimerizar al menos una hora antes de retirar el peine y colocar las muestras. Si el tamaño de las placas era mayor se preparaba la cantidad de gel separador y de empaquetamiento necesario manteniendo estas mismas proporciones.

2.8.1.3. Preparación de las muestras.

Un volumen de muestra conteniendo la cantidad de proteína deseada, normalmente entre 100-200 µg, se completaba hasta 100 µl con agua cuando era necesario y se añadía TCA para una concentración final del 10%. Se dejaba precipitar en hielo unos 10 minutos, y se centrifugaba en frío a 10000 rpm en centrífuga Eppendorf durante 15 minutos. El precipitado se

lavaba con 1 ml de agua fría para eliminar los restos de ácido de las paredes del tubo y del sedimento resuspendiéndolo cuidadosamente. Se volvía a centrifugar 15 minutos en frío. Una vez eliminado exhaustivamente el sobrenadante, se resuspendía el precipitado en 30-80 μ l de solución de Laemmli. Las muestras se calentaban a 42°C hasta que se disolvían totalmente. El máximo de proteína que se aconseja aplicar en el tipo de geles utilizado es de 1 a 10 μ g de proteína por mm^2 de sección de pocillo.

2.8.1.4. Desarrollo de la electroforesis.

Para el desarrollo de la electroforesis se montaban las placas conteniendo el gel en una cubeta para electroforesis vertical. Una vez llenos los reservorios de la cubeta con el tampón de electroforesis, se retiraba el peine y se cargaban las muestras depositándolas cuidadosamente en los pocillos con una jeringa Hamilton. Se completaba con solución de Laemmli para que todas las muestras tuviesen el mismo volumen final (10-20 μ l), se aplicaba un voltaje de 40-50 voltios, en las placas pequeñas, y de 100-150 en las grandes, hasta que las muestras penetraban en el gel separador. Este proceso duraba entre 30 minutos y 2 horas 30 minutos dependiendo de la longitud del gel de empaquetamiento. A continuación se subía el voltaje, a 120-150 voltios en los geles pequeños y a 250 voltios en los geles grandes, y se mantenía constante hasta que el frente visible por la presencia de azul de bromofenol alcanzaba el final del gel. Esto sucedía aproximadamente en 1 ó 2 horas. En las condiciones utilizadas el gel no se calentaba apreciablemente. En este trabajo hemos utilizado marcadores sin preteñir, cuyos pesos moleculares oscilaban entre 200 y 45 KDa, y preteñidos, de pesos moleculares comprendidos entre 180 y 26.6 KDa.

2.8.2. Transferencia.

2.8.2.1. Soluciones empleadas.

*Tampón de transferencia. Se mantenía estéril a 4°C. La concentración a la que se empleaba era:

Glicina 0.19 M

Tris-base 25 mM

Metanol 20%

Se preparaba una disolución con la glicina y el Tris, concentrada 10 veces, y su pH oscilaba entre 8.6 y 8.8. En el momento de usarlo se diluía con agua y metanol.

*Solución de tinción del gel. Se mantenía a temperatura ambiente.

Coomassie blue R-250 0.05%

Metanol 50%

Acido acético 10%

*Solución de tinción de la nitrocelulosa. Se mantenía a temperatura ambiente.

Ponceau S 0.1% (p/v)

Acido acético 5% (v/v)

2.8.2.2. Procedimiento.

La transferencia de proteínas desde el gel a la lámina de nitrocelulosa (Millipore 0.45 μ m de diámetro de poro) se realizaba siguiendo el método semiseco en el que los elementos empleados son humedecidos con un tampón o con agua para permitir el paso de corriente a través de ellos. El aparato de transferencia empleado era de Pharmacia LKB.

Se cortaban 6 papeles Whatman 3M/M y una lámina de nitrocelulosa de las mismas dimensiones del gel separador y se humedecían en el tampón de transferencia y agua respectivamente. Sobre el electrodo de grafito inferior, el positivo, humedecido con tampón de transferencia, se colocaban superponiéndolos 3 de estos papeles Whatman, sobre ellos la lámina de nitrocelulosa y encima el gel separador. Para separar el gel de la placa de cristal donde se había realizado la electroforesis se humedecía con agua, ayudándose de una pipeta Pasteur. Encima del gel se colocaban los 3 papeles Whatman restantes superpuestos humedecidos con el tampón de transferencia. La presencia de burbujas de aire entre estos elementos dificulta la transferencia, por lo que es necesario eliminarlas cada vez que se ponen nuevos elementos sobre los electrodos. Para ello se deslizaba sobre su superficie una pipeta o una varilla de vidrio humedecida en tampón o agua. El electrodo de grafito superior, el negativo, humedecido con tampón, se colocaba cuidadosamente encima de todos los elementos y se conectaba a una corriente continua de intensidad de 2-2.5 mA por cada cm^2 de superficie de electrodo ocupada por los papeles Whatman y se mantenía el paso de corriente durante 90

minutos. Transcurrido este tiempo se desmontaba el sistema, no sin antes marcar el gel y la nitrocelulosa en una esquina para conocer su orientación.

Para comprobar la eficacia de la transferencia y detectar las proteínas que no se habían transferido se teñía el gel con la solución de tinción durante toda la noche. A continuación se eliminaba el colorante sobrante lavando el gel con una solución de ácido acético 10% y metanol 20%. Una vez que se detectaban claramente las bandas de las proteínas se introducía el gel en una solución de glicerol al 3% durante 2 horas y se secaba en secageles a 80°C durante 30-45 minutos.

Por otra parte se teñía la lámina de nitrocelulosa con la solución correspondiente durante 1 ó 2 minutos. A continuación se lavaba con ácido acético al 1% para eliminar la tinción inespecífica del papel y visualizar las bandas de proteínas. Cuando se usaban marcadores no preteñidos se señalaban las bandas correspondientes a los marcadores con lápiz.

2.8.3. Inmunodetección.

2.8.3.1. Soluciones empleadas.

*Tampón PBS. Se preparaba concentrado 10 veces a pH 7.4 y se mantenía estéril a temperatura ambiente. Se usaba a la siguiente concentración:

NaCl 0.14 M

KCl 2.7 mM

KH₂PO₄ 1.5 mM

Na₂HPO₄ 8.1 mM

* Solución de lavado. Tween 20 al 0.1% disuelto en tampón PBS. La solución de Tween 20 se preparaba al 20% (v/v) en agua y se mantenía estéril a 4°C. En el momento de usar la solución de lavado se diluía en PBS para una concentración final de Tween del 0.1%.

* Solución de bloqueo. Se preparaba en el momento de usarla.

Leche en polvo 2% en solución de lavado.

*Buffer AP. Se conservaba a 4°C.

Tris 0.1 M pH 9.5

2.8.3.2. Procedimiento.

Una vez transferidas las proteínas a la lámina de nitrocelulosa, se realizaba la detección

inmunológica del transportador utilizando anticuerpos policlonales y un segundo anticuerpo unido a fosfatasa alcalina. Para ello la nitrocelulosa se cubría con solución de bloqueo y se mantenía en agitación suave durante 1 hora 30 minutos ó 2 horas a temperatura ambiente. A continuación se eliminaba la solución de bloqueo y se cubría la nitrocelulosa con 0.1 ml/cm² de una solución 1/1000 de los anticuerpos policlonales frente al transportador de maltosa en solución de bloqueo. Tras mantenerlo a temperatura ambiente durante al menos una hora y en agitación suave se retiraba el líquido que se guardaba a 4°C para su reutilización. Se lavaba 5 veces durante 5 minutos cubriendo la nitrocelulosa con la solución de lavado.

Para detectar la banda del transportador unido a sus anticuerpos empleábamos un segundo anticuerpo unido a fosfatasa alcalina. Esta enzima en presencia de los sustratos NBT y BCIP da lugar a la aparición de color púrpura allí donde se encuentra el anticuerpo secundario unido al primario. Para ello la lámina de nitrocelulosa se sumergía en el anticuerpo secundario diluido 1/3000 con la solución de bloqueo, se incubaba 30 minutos a temperatura ambiente y en agitación suave. Posteriormente se lavaba con la solución de lavado 5 veces durante 5 minutos. Antes de añadir los sustratos de la fosfatasa alcalina se lavaba 2 veces durante 5 minutos, con tampón AP. Los sustratos de la reacción NBT y BCIP se preparaban en el momento de usarlos, diluyéndolos 100 veces en tampón AP y teniendo en cuenta que la relación BCIP/NBT es 2/1. La lámina de nitrocelulosa se mantenía en agitación suave en esta solución hasta que aparecía color, entre 10-30 minutos. Después se retiraba la solución de colorante y se lavaba con agua 2 ó 3 veces para detener la reacción, se dejaba secar sobre un papel de filtro y se guardaba en oscuridad.

La intensidad de la reacción de color se cuantificaba en los casos en que fue necesario midiendo la densidad de la banda utilizando un densitómetro LaCie acoplado a un ordenador, empleando el programa Image 1.42. El área del pico obtenido se medía en pixels.

2.8.4. Purificación de anticuerpo por afinidad con antígeno inmovilizado en nitrocelulosa.

2.8.4.1. Procedimiento.

El método empleado se basa en el descrito por Lillie y Brown (1987). Se preparaba un gel del 10% de poliacrilamida en placas de 16x16 cm. Entre las placas de vidrio se introducía un peine de teflón con un pocillo continuo de 9 cm y tres peines de un solo pocillo, distribuidos a ambos lados del peine. En el pocillo grande se aplicaban 250 μg de proteína de una muestra de fracción purificada de membrana plasmática obtenida a partir de células crecidas en maltosa (Métodos 2.8.1.3.). En dos de los pocillos pequeños situados a cada lado del pocillo central se aplicaban 20 μg de proteína de sendas alícuotas de la misma muestra. En el pocillo restante se aplicaban 20 μg de proteína de una muestra obtenida a partir de fracción purificada de membrana plasmática de células crecidas en glucosa a modo de control. El desarrollo de la electroforesis y la transferencia de las proteínas del gel a papel de nitrocelulosa se realizaba tal como se indica en Métodos 2.8.1. y 2.8.2. Una vez que se visualizaban en la membrana de nitrocelulosa las bandas de proteínas teñidas con rojo Ponceau se recortaban los carriles correspondientes a los pocillos pequeños y se procedía a la detección inmunológica del transportador de maltosa en estos carriles tal como se indica en Métodos 2.8.3. La nitrocelulosa correspondiente al carril central se bloqueaba, se lavaba con agua y se mantenía a 4°C hasta su uso. Una vez identificada la posición del transportador en los papeles pequeños de nitrocelulosa, se reconstituía la membrana original de nitrocelulosa utilizando estos papeles y la nitrocelulosa correspondiente al carril central. De esta forma se localizaba la banda del transportador en la nitrocelulosa correspondiente al carril central (Métodos 2.8.3.2.). Se recortaba la banda, se dividía en tres tiras de 3x1 cm, aproximadamente, cada una que se sometían sucesivamente al tratamiento que se describe a continuación. Una tira de nitrocelulosa conteniendo la banda del transportador se colocaba en una placa petri pequeña y se humedecía bien con PBS o líquido de bloqueo, se cubría con 200 μl de suero que contiene el anticuerpo primario diluido 5 veces en PBS (Métodos 2.8.3.1.) y se incubaba en agitación durante 2 horas

a temperatura ambiente en presencia de una torunda de algodón empapada en agua. Transcurrido este tiempo se recogía exhaustivamente el suero y con él se cubría la segunda tira de nitrocelulosa y se procedía a incubarla como se ha descrito. Tras 2 horas de incubación se recogía el suero y se pasaba a la tercera tira que se incubaba en las mismas condiciones. El suero recuperado tras las 3 incubación se guardaba a 4°C, para su posible reutilización.

Tras su incubación con el suero, las tiras se lavaban 5 veces con 2 ml de PBS durante 5 minutos. Se eliminaba bien el líquido y se evitaba en todo momento que se secasen. A continuación se eluía el anticuerpo fijado al transportador incubando una de las tiras 15 minutos con 0.25 ml de 5 M guanidina-HCl pH 6.8 a temperatura ambiente. Se recogía el líquido de la elución que se pasaba sucesivamente a las otras dos tiras para ser eluidas como se ha descrito. Este proceso de elución se repetía una segunda vez con otros 0.2 ml de la solución de guanidina-HCl. Los dos líquidos de la elución resultantes se reunían. Posteriormente se lavaban cada una de las tiras 5 minutos 3 veces con 2 ml de PBS y se guardaban a -70°C para su eventual utilización posterior .

Al líquido de elución, aproximadamente 0.4 ml, se le añadía 25 µl de PBS concentrado 10 veces y se introducía en una tripa de diálisis. Se dejaba dializando toda la noche a 4°C en un litro de PBS. Tras la diálisis se recogía el líquido que contenía el anticuerpo primario purificado, se alicuotaba y se guardaba a -70°C.

2.8.4.2. Titulación del anticuerpo purificado.

La titulación se realizó para establecer cual era la mínima dilución de la solución de anticuerpo purificado capaz de detectar antígeno en inmunoensayo. Se preparó un gel del 10% de poliacrilamida y se aplicaron 25 y 50 µg de proteína alternativamente. El desarrollo de la electroforesis y la transferencia se realizaron como se indica en los apartados 2.8.1. y 2.8.2. La nitrocelulosa teñida con rojo Ponceau's se cortaba en tiras que contenían carriles de 25 y 50 µg de proteína cada una. Tras el bloqueo se incubó cada tira durante 2 horas a temperatura ambiente y en agitación con diferentes diluciones de la solución de anticuerpo purificado. El resto de la detección inmunológica se realizaba como se indica en el apartado 2.8.3.

2.8.5. Inmunofluorescencia.

Basado en los métodos descritos por Pringle *et al* (1991).

2.8.5.1. Soluciones empleadas.

*KH₂PO₄ 1 M pH 6.5. Se ajustaba el pH con KOH 1M y se mantenía a 4°C.

*Formaldehido 37%. El formaldehido comercial que se emplea en histología está estabilizado con metanol y carbonato cálcico. Antes de usarlo hay que filtrarlo a través de filtros de nitrocelulosa.

*Tampón SP.

Sorbitol 1.2 M

KH₂PO₄ 50 mM pH 7.5

El pH se ajustaba con KOH.

*Zymoliasa 20T 12.5 mg/ml. Se preparaba disolviéndola en tampón SP en presencia de 20 mM β-mercaptoetanol. Se guardaba en alícuotas a -70°C.

*Polilisina 1 mg/ml. Se preparaba disuelta en agua y se guardaba congelada a -20°C. Con ella se cubría la superficie de los pocillos del porta que íbamos a utilizar. 25 µl de polilisina se depositaban sobre cada uno de los pocillos del porta multipocillo, se dejaba 5 minutos a temperatura ambiente y se aspiraba el líquido y se dejaba secar al aire. A continuación se lavaban los pocillos con 25 µl de PBS (Métodos 2.8.3.1) dos veces durante 5 minutos cada vez y se lavaba una vez más con 25 µl de agua, durante 5 minutos. Los portas se preparaban por lo menos una hora antes de ser usados y se pueden guardar varios días antes de aplicarles las células.

*Anticuerpo secundario policlonal conjugado a rodamina. Estos anticuerpos corresponden a la fracción total de inmunoglobulinas obtenida en cabra inmunizada contra suero de conejo. Se preparaba diluyéndolo 100 veces en PBS (Métodos 2.8.3.1) y añadiendo suero de cabra diluido 50 veces.

*DAPI 10 µg/ml de PBS. Se preparaba en el momento de usarlo a partir de una solución 100 µg/ml en agua que se guardaba congelada a -70°C.

*Líquido de montaje.

p-fenilendiamina 1 mg/ml

glicerol 90%

DAPI 0.022 ppm

La p-fenilendiamina se preparaba concentrada 10 mg/ml en PBS a pH 9 y se guardaba congelada a -20°C en oscuridad. El líquido de montaje se guardaba congelado a -70°C.

2.8.5.2. Procedimiento.

2.8.5.2.1. Fijación.

La fijación de las células se realizaba añadiendo 12.5 ml de KH_2PO_4 1 M pH 6.5 y 12.5 ml de formaldehído 37% a 100 ml de cultivo de una DO aproximada de 0.5 y manteniéndolo en agitación suave a temperatura ambiente durante 2 horas. Transcurrido este tiempo se centrifugaban 100 ml a 3000 rpm en Wifug 2000S durante 3 minutos. Las células se lavaban con 15 ml de tampón SP, se centrifugaban y se resuspendían en 1.5 ml del mismo tampón. Esta suspensión se puede guardar a 4°C al menos durante una semana.

2.8.5.2.2. Obtención de protoplastos.

De la suspensión de células fijadas se cogían 0.3 ml (2×10^8 células aproximadamente) y se añadían 1.2 μl de β -mercaptoetanol 5 M para una concentración final de 20 mM y 3 μl de la solución zymoliasa 20T a una concentración 125 $\mu\text{g/ml}$. Se incubaba a 37°C, con agitación suave durante 60 minutos, se centrifugaba en tubos Eppendorf a baja revolución (1000 rpm) durante 10 minutos a temperatura ambiente. Las células se lavaban con 1 ml de tampón SP, se centrifugaban de nuevo y se resuspendían con una varilla suavemente para no deformar los protoplastos en 0.350 ml de tampón SP. Los protoplastos son estables a 4°C durante 24 horas.

2.8.5.2.3. Aplicación de las células al porta.

10 μl de la suspensión conteniendo 6×10^6 células aproximadamente se depositaban en un pocillo del porta multipocillo tratado con polilisina, se dejaban 10 segundos y se aspiraba el líquido y se dejaban secar al aire las células pegadas al porta. En ese momento se comprobaba al microscopio que había una densidad adecuada de células en el pocillo.

2.8.5.2.4. Permeabilización.

Para permeabilizar las membranas y que el anticuerpo tuviese acceso a los antígenos situados en el interior celular, los portas se sumergieron 5 minutos en metanol y después 30 segundos en acetona, ambos preenfriados a -20°C, y se dejaban secar al aire.

2.8.5.2.5. Detección inmunológica.

Las incubaciones se hacían a temperatura ambiente colocando el porta en una placa petri,

cuya base se había forrado con papel de filtro húmedo y una torunda de algodón húmeda, para evitar desecación. La unión inespecífica de proteínas se bloqueaba añadiendo 25 μ l de una solución que contiene 1 mg/ml de BSA en PBS durante 30 minutos. Se aspiraba el líquido, se añadían 10 μ l de anticuerpo primario purificado por afinidad y se incubaba durante 2 horas. El anticuerpo se utilizaba de 5 a 10 veces más concentrado que en inmunoensayo. Se aspiraba el líquido y se lavaba con 25 μ l de BSA-PBS 5 veces durante 5 minutos cada vez, aspirando el líquido cada vez.

A continuación se incubaba con el anticuerpo secundario conjugado con rodamina. Para ello se añadían 10 μ l del anticuerpo secundario preparado como se describe en 2.8.5.1. y se mantenía en oscuridad durante 1 hora. Se lavaba con 25 μ l de PBS 5 veces durante 5 minutos cada vez aspirando el líquido después de cada lavado y manteniendo siempre la placa en oscuridad. Se incubaba 5 minutos con 15 μ l de una solución de DAPI 10 μ g/ml de PBS y se lavaba de nuevo 5 veces 5 minutos cada vez con PBS en las mismas condiciones que los lavados anteriores. Se añadían 10 μ l de líquido de montaje. Se colocaba el cubre y se sellaba con laca de uñas transparente.

Las células pueden mirarse al microscopio directamente o se puede guardar el porta a -20°C , en oscuridad, hasta su observación. Para la observación de las células se usaba un microscopio Zeiss Axiophot. Se añadía una gota de aceite de inmersión sobre el cubre y se utilizaban los filtros 450-490, FT510, LP520 para rodamina y BP546, FT580, LP590 para observar el DAPI asociado al DNA. Las células se fotografiaban empleando una película HP50 de 400 ASA de sensibilidad. El tiempo de exposición se determinó automáticamente.

2.9. Técnicas de biología molecular.

2.9.1. Transformación de *E. coli*.

Se basa en el método descrito por Hanahan (1986). Lo empleamos para amplificar y conservar el plásmido. Células de *E. coli* competentes preparadas según se describía en el método de Hanahan fueron congeladas a -70°C . En el momento de usarlas se dejaban

descongelar en hielo y se separaban alícuotas de 50 μ l en Eppendorf estériles. Se añadía 0.5 μ g de DNA plasmídico y, en el caso del control, el mismo volumen de tampón TE estéril (Tris-HCl 10 mM pH 7.6, EDTA 1 mM). Se incubaba en hielo durante 30 minutos y a continuación la suspensión se sometía a un choque térmico a 42°C. El tiempo que duraba la incubación a 42°C variaba según la cepa de *E. coli* empleada, pero como norma general puede mantenerse durante 2 minutos. Se añadían 5 volúmenes de medio LB (Materiales 1.3.2) y se incubaba 1 hora a 37°C para que se expresara el gen de resistencia al antibiótico presente en el plásmido. Se extendían 50-200 μ l en placas de LB con el antibiótico y se incubaban a 37°C. Una vez obtenidas colonias aisladas éstas se sembraban en el medio líquido selectivo (LB con el antibiótico) para obtener más masa celular. De este cultivo se guardaban células a -70°C mezclándolo con glicerina estéril al 30%. De esta forma podíamos disponer del plásmido tan sólo con crecer las bacterias y aislando el DNA plasmídico como se describe a continuación.

2.9.2. Aislamiento de DNA plasmídico de *E. coli*.

Se empleaban dos métodos diferentes dependiendo de la cantidad de DNA que se deseaba obtener.

2.9.2.1. Aislamiento de DNA plasmídico a gran escala.

2.9.2.1.1. Soluciones empleadas.

*Solución de lisis: se esterilizaba y se guardaba a -20°C.

Glucosa 1%

Tris 25 mM

EDTA 10 mM pH 8

*SDS-NaOH: se preparaba en el momento de usarlo a partir de una solución de 10% SDS y de NaOH 19M. Las concentraciones a las que se empleaban eran

SDS 1%

NaOH 0.19 M

*RNasa 10 mg/ml. Se disolvía en una solución de 10 mM Tris y 15 mM NaCl pH 7.5, ajustando el pH con HCl, hirviendo 10 minutos. Se guardaba congelada a -20°C.

*Fenol-cloroformo-alcohol isoamílico: en las proporciones 24:24:1.

*Lisozima 5%. Se disolvía en agua 50 mg/ml. Se guardaba congelada en pequeñas

alícuotas que no deben descongelarse más de 10 veces.

*Tampón TE. Se preparaba concentrado 10 veces y se guardaba estéril a temperatura ambiente. Se usaba a la siguiente concentración:

Tris-HCl 10 mM pH 7.6

EDTA 1 mM

* Etanol-acetato amónico 7.5 M. Se preparaba a partir de una solución de acetato amónico 7.5 M estéril. A 6 partes de etanol se le añadía 1 parte de acetato amónico. Se guardaba en nevera.

2.9.2.1.2. Procedimiento.

El método empleado está basado en el descrito por Birnboim (1983). 100 ml de medio LB con ampicilina se inoculaban con *E. coli* previamente transformada y se dejaban durante toda la noche en agitación a 37°C. Las células se recogían en 3 tubos estériles de 30 ml de capacidad y se centrifugaban a 6000 rpm durante 10 minutos. Cada sedimento se lavaba con 0.5 ml de agua estéril, se juntaban en un tubo y se completaba el volumen hasta 20 ml de agua. Se centrifugaba de nuevo a 6000 rpm en Beckman J2-21, con el rotor JA-20, durante 10 minutos. El sedimento se resuspendía primero en 0.5 ml de la solución de lisis y después se añadían 4.5 ml de la misma solución, cuidando que no quedasen grumos de células. Se añadían 0.1 ml de lisozima al 5% y se incubaba en hielo 10 minutos.

A los protoplastos obtenidos se les añadían 10 ml de la solución de SDS-NaOH, se mezclaban suavemente y se dejaban en hielo durante 10 minutos. A continuación se precipitaba el DNA cromosómico neutralizando el medio al añadir 7.5 ml de acetato potásico 3 M a pH 4.8. Se mezclaba por inversión y se dejaba de 30 a 60 minutos en hielo. Se centrifugaba en frío a 15000 rpm durante 5 minutos. El sobrenadante se filtraba con una jeringuilla taponada con lana de vidrio silanizada, papel de filtro o gasa estéril y se recogía en el mismo tipo de tubos. Se añadían 15 ml de isopropanol comercial y se dejaban 10 minutos a -20°C; se centrifugaban a 10000 rpm durante 10 minutos al cabo de los cuales se eliminaba bien el sobrenadante dejando el tubo invertido sobre una servilleta. El precipitado se resuspendía en 2 ml de TE agitando en vórtex 1 ó 2 minutos. A continuación se eliminaba el RNA con 2.5 ml de LiCl 6 M, dejándolo en hielo 15 minutos y centrifugando a 10000 rpm 10 minutos. Al sobrenadante obtenido se le

añadían 5 ml de isopropanol, se incubaba 10 minutos a -20°C y se volvía a centrifugar como en el paso anterior. Se eliminaba el sobrenadante y el precipitado se resuspendía en 1 ml de TE, ayudándose del vórtex. Esta suspensión se pasaba a un Eppendorf de 2.5 ml al que se añadían $10\ \mu\text{l}$ de RNasa 10 mg/ml y se incubaba 15 minutos a 37°C . Con este tratamiento se eliminaba el resto de RNA que no hubiese sido eliminado con el LiCl. Para eliminar las proteínas residuales se efectuaba un tratamiento con fenol-cloroformo. Para ello, se añadía 1 ml de la mezcla fenol-cloroformo-isoamílico, se centrifugaba rápidamente unos 10 segundos, se tomaba la capa superior y se pasaba a otro tubo. Se repetía otra vez esta operación y a continuación se purificaba el DNA plasmídico. Para ello se añadían 0.1 ml de acetato sódico 3 M pH 5.2 y 1 ml de isopropanol. Se dejaba 10 minutos a -20°C y se centrifugaba 10 minutos a 10000 rpm. Se eliminaba el isopropanol y se resuspendía en 0.5 ml de TE. Se añadían 1.75 ml de etanol-acetato amónico 7.5 M. Se dejaba 10 minutos a -20°C y se volvía a centrifugar a 10000 rpm 10 minutos. El precipitado se lavaba con 1 ml de etanol 70% y se secaba bien, a vacío. Se resuspendía en $200\ \mu\text{l}$ de TE. Se centrifugaba 2 minutos a 10000 rpm y el sobrenadante se recogía en un tubo estéril. En nuestro laboratorio se considera que a 260 nm de longitud de onda 1 ml de esta suspensión a 1 de DO contiene $50\ \mu\text{g}$ de DNA plasmídico.

2.9.2.2. Obtención de DNA plasmídico en pequeña escala.

2.9.2.2.1. Soluciones empleadas.

*STET. Se esterilizaba por calor y se guardaba a 4°C .

Sacarosa 10%

Tris-HCl 50 mM pH 8

EDTA 50 mM pH 8

Tritón X-100 1%

2.9.2.2.2. Procedimiento.

El método empleado se basa en el descrito por Holms y Quigley (1981). Se crecieron 4 colonias de *E. coli* conteniendo el DNA plasmídico en medio LB con ampicilina a 37°C durante al menos 5 horas. Se podían dejar incluso toda la noche. De este cultivo se recogían volúmenes de 1 ml en tubos Eppendorf estériles. Se centrifugan a 10000 rpm durante unos 15 segundos y

se retiraba el sobrenadante con ayuda de una pipeta Gilson. A continuación se añadían 0.5 ml de solución STET, se resuspendía con pipeta Gilson y se mezclaba por inversión con 5 µl de lisozima 5 % (Métodos 2.9.2.1.1). Las muestras se hervían a 100°C durante 2 minutos y después se centrifugaban a 10000 rpm durante 15 minutos a temperatura ambiente. Con un palillo estéril se retiraba el precipitado. Todo el material sobrante que se haya obtenido hasta este punto debe esterilizarse antes de tirarlo. A continuación se recogía el sobrenadante que contenía DNA y RNA y se completaba el volumen con TE hasta 0.5 ml aproximadamente, se añadían 10 µl de NaCl 5 M y 400 µl de isopropanol. Se agitaba por inversión y se dejaba a -20°C durante al menos 10 minutos. Se centrifugaba 10 minutos y se eliminaba el sobrenadante a vacío. Para eliminar las sales del medio, al precipitado obtenido se le añadía 1 ml de etanol al 70% y se centrifugaba 2 minutos. Se eliminaba el sobrenadante con bomba de vacío y para eliminarlo del todo se centrifugaba de nuevo brevemente y el sobrenadante se eliminaba con pipeta Gilson. El precipitado obtenido se dejaba secar unos 5 minutos y posteriormente se resuspendía en 40 µl de TE y se congelaba a -20°C.

2.9.3. Transformación de células intactas de *S.cerevisiae*.

2.9.3.1. Soluciones empleadas.

*TELi. El LiCl se preparaba a una concentración 10 veces mayor en TE (Métodos 2.9.1.1.1) también concentrado 10 veces; se esterilizaba por filtración y se mantenía a temperatura ambiente. La concentración a la que se usaba era

LiCl 0.1 M en TE

*PEG-TELi. La solución de PEG 4000 se preparaba al 40% en TELi y se esterilizaba por filtración. En el momento de usarla se mezclaban 9 partes de PEG 4000 al 40% con 1 volumen de la solución de TELi concentrada, de modo que la concentración final de PEG 4000 era del 36%.

2.9.3.2. Procedimiento.

Se siguió el método descrito por Ito *et al.* (1983) modificado por Becker y Guarente (1991). Las células se crecían en YP (Materiales 1.3.1.4) hasta una DO entre 0.5 y 1 medida a 640 nm. Se recogían 10 ml de cultivo, se centrifugaban en centrífuga de mesa y se lavaban con

10 ml de agua estéril y luego con 10 ml de TELi. A continuación se resuspendían con un volumen de la solución anterior, correspondiente a una dilución 1/100 del cultivo original y se incubaban a 30°C durante 1 hora, con agitación suave. Transcurrido este tiempo se dividía en alícuotas de 100 µl en Eppendorf estériles, se añadían 50 µg del DNA "carrier" y el DNA plasmídico (1-10 µg, en menos de 20 µl). Se incubaba a 30°C sin agitación durante 20 ó 30 minutos y al cabo de este tiempo se agitaba para resuspender y se añadían 0.7 ml de la solución de PEG 4000 al 36%. Se incubaba 1 hora a 30°C y se sometían las células a un choque térmico a 42°C durante 5 minutos. Finalmente se centrifugaban 10 segundos en centrífuga Eppendorf, se resuspendían en 0.2 ml de sorbitol 1M y se sembraba en medio sólido selectivo.

RESULTADOS

RESULTADOS

1. INACTIVACION CATABOLICA DEL TRANSPORTADOR DE K⁺.

Como se ha descrito más arriba los transportadores de azúcares en levadura se inactivan rápidamente tras la inhibición de la síntesis de proteínas. Esta inactivación, conocida como inactivación catabólica, sigue una cinética de primer orden, se debe a cambios en la V_{max} , es dependiente de energía y estimulada por la presencia de sustratos fermentables. En estas condiciones la vida media de estos transportadores oscila entre 1 y 5 horas (Busturia y Lagunas, 1985; Busturia y Lagunas, 1986; DeJuan y Lagunas, 1986). Para ver si esta inactivación es una peculiaridad de los transportadores de azúcares o si también afecta a otras proteínas de membrana plasmática hemos investigado la estabilidad del sistema de transporte de K⁺.

1.1. Puesta a punto del método de valoración.

La actividad del sistema de transporte de K⁺ puede determinarse midiendo la captación por las células de dos cationes distintos: K⁺ o Rb⁺. En el primer caso se utiliza el isótopo radiactivo ⁴²K⁺ (Rodríguez-Navarro y Ramos, 1984) y en el segundo caso bien Rb⁺ bien su isótopo radioactivo ⁸⁶Rb⁺ (Ramos y Rodríguez-Navarro, 1986). El Rb⁺ se determina muy fácilmente por espectroscopía de absorción atómica y su uso presenta las ventajas inherentes a todo sustrato no radiactivo.

Está bien establecido que la captación de Rb⁺ por la levadura es inhibida por el contenido intracelular de K⁺ a las concentraciones a las que este catión se halla normalmente en este organismo. Por ello los ensayos de captación de Rb⁺ se llevan a cabo utilizando células cuyo contenido intracelular de K⁺ se halla disminuído. Para ello se tratan con azida sódica (ver Métodos 2.3.2.1) con lo que se consigue que el K⁺ intracelular descienda desde una concentración de 500 nmol/mg PS de células a 230-250 nmol/mg PS. El empleo de la azida presenta la ventaja de que sus efectos sobre el potencial de membrana plasmática desaparecen 1 ó 2 minutos después de eliminarla del medio. Para restablecer el potencial de membrana basta

con tratar las células con glucosa como se describe en Métodos 2.3.2.1.

El ensayo del transporte de K^+ empleando Rb^+ ya ha sido descrito en detalle (Ramos y Rodríguez- Navarro, 1986). Sin embargo, dado que la velocidad de captación de este catión depende de la cepa de levadura empleada tuvimos que establecer las condiciones óptimas para nuestro ensayo. El transporte se determina midiendo el aumento en el contenido intracelular de Rb^+ . El ensayo se inicia cuando se añade Rb^+ a una suspensión de células. Tras incubarse a $30^\circ C$ se recogen a tiempos crecientes, nunca superiores a cuatro minutos, cuatro alícuotas conteniendo dos cantidades diferentes de células que se van alternando. Se comienza por una de las dos alícuotas con más cantidad de células. Con ello se pretende que la última alícuota sea una de las de menos cantidad de células y, con ello, que el riesgo de superar el límite de detección del espectrofotómetro sea mínimo. En un primer tanteo realizamos un experimento en el que, a partir de una suspensión de células conteniendo 0.5 mg de proteína/ml y 5 mM $RbCl$, tomamos alícuotas de aproximadamente 1 y 0.5 mg de proteína. Los resultados se muestran en la figura 3A. Como se puede ver, la captación de Rb^+ fue proporcional al tiempo de incubación durante la recogida de las tres primeras alícuotas. Al cabo de este tiempo se perdió la linealidad, lo que probablemente se debió a que se alcanzó el límite superior de detección del espectrofotómetro. Decidimos, por tanto realizar otro experimento disminuyendo la cantidad de células en el ensayo. Observamos que utilizando alícuotas que contenían aproximadamente 0.6 y 0.3 mg de proteína, la acumulación de Rb^+ se mantuvo lineal durante el tiempo de recogida de las cuatro alícuotas (Fig. 3B). En este caso la cantidad de Rb^+ acumulado se mantuvo dentro de los límites de detección del espectrofotómetro. Además, la filtración de alícuotas con menor cantidad de células permitió que el ensayo se realizara en períodos de tiempo más cortos, lo que representa una ventaja desde el punto de vista analítico. Como conclusión de estos experimentos, decidimos filtrar alícuotas conteniendo 0.6 y 0.3 mg de proteína y realizar la filtración lo más rápidamente posible.

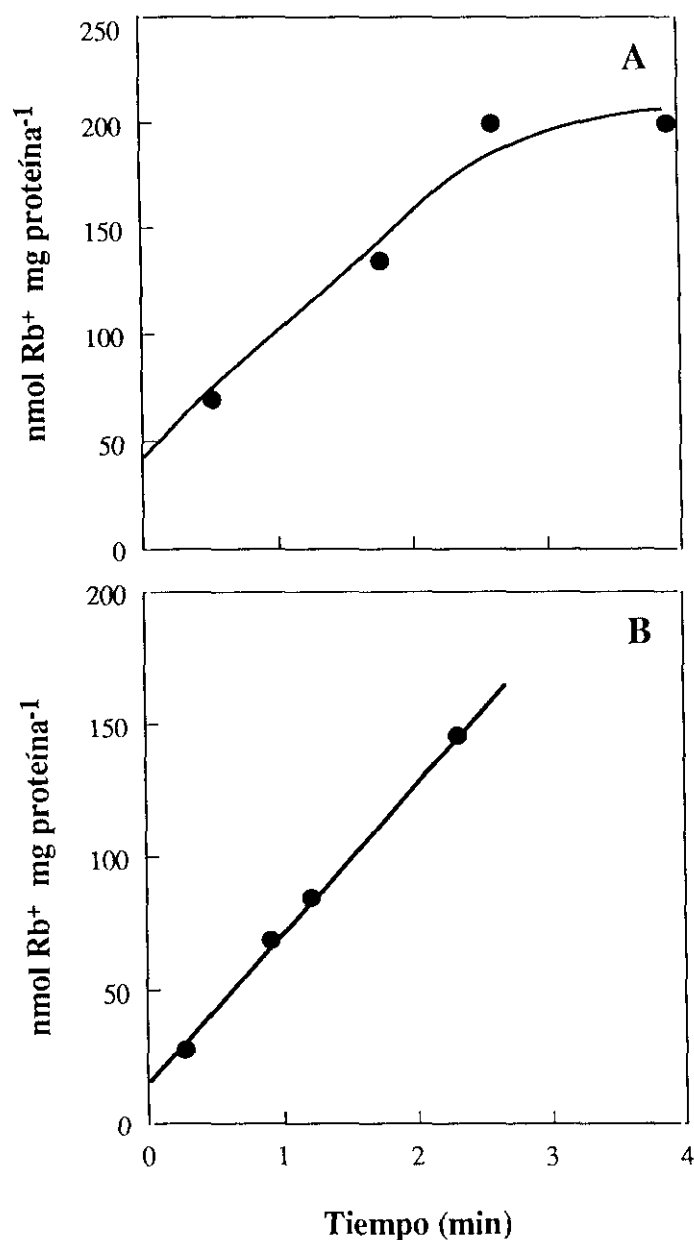


Figura 3. Efecto de la cantidad de proteína presente en la medida del transporte de K⁺.

Las células se crecieron a 30°C en medio mínimo sintético (Materiales 1.3.1.1.) con glucosa al 2%. A mitad de la fase exponencial de crecimiento, las células se recogieron por centrifugación a 5000 rpm durante 3 minutos y se trataron como se describe en Métodos 2.3.2.1., para medir el transporte de K⁺, utilizando 5 mM RbCl como sustrato (Métodos 2.3.2.2.). (A) Se utilizaron alternativamente dos alícuotas de 1 mg de proteína y dos alícuotas de 0.5 mg de proteína. (B) Se utilizaron alternativamente dos alícuotas de 0.6 mg de proteína y dos alícuotas de 0.3 mg de proteína.

1.2. Inactivación catabólica.

1.2.1. Efecto de la inhibición de la síntesis de proteínas sobre la actividad del transportador de K^+ , en presencia y ausencia de un sustrato fermentable.

Resultados previos obtenidos en nuestro laboratorio habían mostrado que durante la inhibición de la síntesis de proteínas, ya sea por la adición de cicloheximida o por ayuno de una fuente de nitrógeno, se produce una inactivación de los transportadores de azúcares (Lagunas *et al*, 1982), que es más rápida en presencia de un sustrato fermentable que en presencia de un sustrato no fermentable. Para averiguar si esta inactivación es un fenómeno específico de los transportadores de azúcares o si también afecta al transportador de K^+ medimos la eventual inactivación de este transportador en la cepa ATCC 42407 (Tabla 1). Esta cepa ha sido la utilizada en el estudio de la inactivación de los transportadores de azúcares (Lagunas *et al*, 1982).

Observamos que cuando levaduras creciendo en un medio con glucosa como fuente de carbono, se recogían en fase exponencial de crecimiento y se resuspendían en un medio fresco conteniendo el mismo azúcar, la adición de cicloheximida producía un descenso en la actividad del transportador de K^+ que seguía una cinética de primer orden (Fig. 4). A partir de estos datos pudimos calcular que la vida media de este transportador en ausencia de síntesis de proteínas y en presencia de un sustrato fermentable es de unas 3.5 horas.

Ahora bien, cuando en vez de glucosa, las células fueron resuspendidas en un medio fresco conteniendo etanol como fuente de carbono, la adición de cicloheximida produjo un descenso en la actividad del transportador de K^+ mucho más lenta y de los datos mostrados en la figura 4 pudimos calcular que la vida media en presencia de este sustrato no fermentable fue mayor de 15 horas. Estos resultados muestran que, al igual que los transportadores de azúcares, el transportador de K^+ sufre un proceso de inactivación catabólica y que esta inactivación es estimulada por la presencia de un sustrato fermentable.

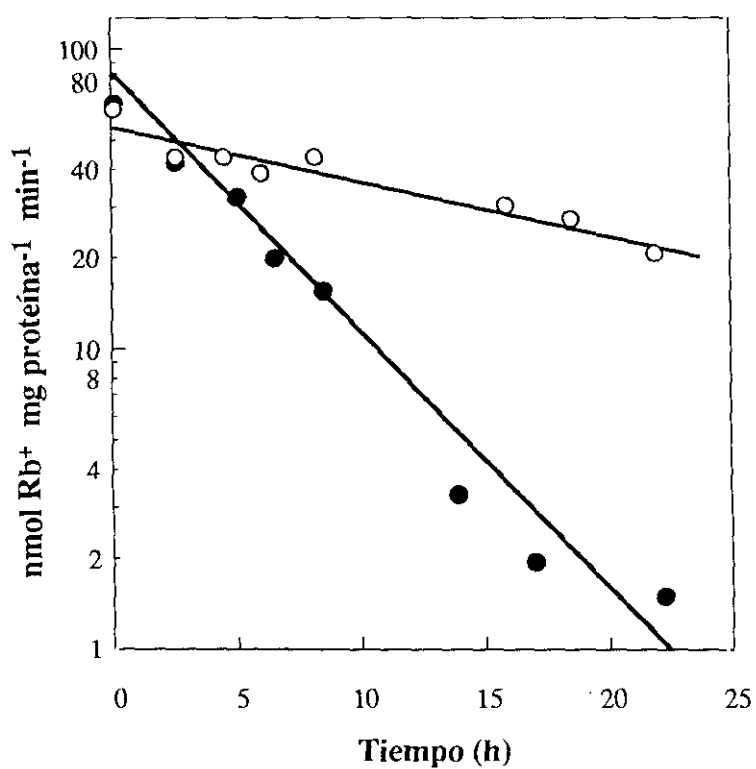


Figura 4. Inactivación del transportador de K^+ durante el ayuno de fuente de nitrógeno en presencia y ausencia de un sustrato fermentable.

Las células se crecieron a 30°C en medio mínimo con glucosa al 2%. A mitad de la fase exponencial de crecimiento se transfirieron a un volumen 3 veces superior de medio fresco en presencia de $10\ \mu\text{g/ml}$ de cicloheximida, $250\ \mu\text{g/ml}$ de clorhidrato de tetraciclina y glucosa al 2% (●) o etanol al 2% (○) (Métodos 2.2). Se incubaron a 30°C y a los tiempos indicados se recogieron alícuotas en las que se valoró el transporte de K^+ . Los datos corresponden a la media de al menos dos experimentos.

1.2.2. Efecto de la inhibición de la síntesis de proteínas sobre la afinidad del transportador de K^+ .

Se ha visto que la inactivación catabólica de los transportadores de azúcares es debida fundamentalmente a un descenso en su V_{max} . En el caso de los transportes de glucosa y maltosa no se aprecian cambios en sus respectivas K_m , mientras que en el caso del transporte de galactosa se observa un leve descenso. Nos propusimos averiguar si en el caso del transportador de K^+ la inhibición es debida a cambios en su V_{max} , su K_m o si ambos parámetros cinéticos se afectaban durante el proceso.

La K_m del transportador de K^+ para el Rb^+ cuando el contenido en K^+ en las células es bajo es de aproximadamente 0.2 mM (Rodríguez-Navarro y Ramos, 1984). Por lo tanto en nuestras células, que han sido tratadas para disminuir su K^+ intracelular, el transporte de K^+ estará muy próximo a saturación en presencia de 5 mM Rb^+ , que es la concentración habitualmente presente en los ensayos. Ahora bien, si la inactivación observada se debiera a una caída en la afinidad del transportador podría suceder que a esa concentración de Rb^+ el transportador no se hallara saturado. Para probar esta hipótesis determinamos la actividad del transportador durante la inactivación a dos concentraciones de Rb^+ , 2.5 y 5 mM. Nuestra hipótesis de trabajo era que si la afinidad disminuye durante la inactivación, la relación de actividades observada a 5 y 2.5 mM iría aumentando con el tiempo de inactivación. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 2.

Se observó que la relación de actividades a ambas concentraciones se mantuvo constante durante todo el proceso de inactivación. Este hecho sugiere que el grado de saturación de la proteína se mantuvo constante durante las 24 horas de inactivación a que se sometieron las células. Tras este período la inactivación fue superior al 95%. Estos hechos sugieren fuertemente que la inactivación del transportador de K^+ no se debe a cambios de la afinidad sino a cambios de la V_{max} .

Tabla 2. Relación de actividades del transportador de K⁺ a 5 y 2.5 mM Rb⁺.

Tiempo (h)	V (nmoles Rb ⁺ mg proteína ⁻¹ min ⁻¹)		
	Concentración de Rb ⁺		
	5 mM Rb ⁺	2.5 mM Rb ⁺	5 mM/2.5 mM Rb ⁺
0	143	117	1.22
3	110	98	1.12
6	93	63	1.48
9	50	42	1.19
15	20	17	1.18
24	6.7	5	1.34

Las células se crecieron a 30°C en un medio mínimo en presencia de glucosa al 2%. A mitad de la fase exponencial de crecimiento se transfirieron a un volumen 3 veces superior de medio fresco en presencia de glucosa al 2%, 10 µg/ml de cicloheximida y 250 µg/ml de clorhidrato de tetraciclina. Se incubaron a 30°C y a los tiempos indicados se recogieron alícuotas en las que se valoró el transporte de K⁺ en presencia de 5 y 2.5 mM de RbCl.

1.2.3. Dependencia de energía.

Se ha visto que la inactivación de los transportadores de azúcares es dependiente de energía (Busturia y Lagunas, 1985; Busturia y Lagunas, 1986; DeJuan y Lagunas, 1986). Nuestro siguiente objetivo fue establecer si la inactivación del transportador de K^+ presentaba también este requerimiento.

En levaduras creciendo en glucosa funcionan dos vías catabólicas que producen ATP, la respiración y la fermentación. Ahora bien en el caso de células utilizando etanol, la única vía funcional productora de ATP es la respiración y, como consecuencia, si se bloquea esta vía los niveles de ATP dentro de la célula disminuyen. Nuestra hipótesis de trabajo era que si la inactivación catabólica del transportador de K^+ era dependiente de energía, la velocidad de inactivación debería disminuir cuando se bloqueara la producción de energía. Para probar esta hipótesis, ensayamos el efecto de la antimicina A, un inhibidor de la respiración, sobre la inactivación del transportador de K^+ en células utilizando etanol. Observamos que la presencia del antibiótico produjo un descenso en la velocidad de inactivación del transportador de K^+ , que pasó de tener una vida media de unas 10 horas a tener una vida media superior a 30 horas (Fig. 5). Estos resultados sugieren que, al igual que la inactivación de los transportadores de azúcares, la inactivación del transportador de K^+ es dependiente de energía.

1.3. Efecto de la inactivación de la H^+ -ATPasa sobre la actividad del transportador de K^+ .

La H^+ -ATPasa es una enzima situada en la membrana plasmática, encargada de bombear H^+ al exterior celular. Como consecuencia de esta expulsión de H^+ se crea un potencial de membrana que permite la entrada en la célula de nutrientes, como por ejemplo el K^+ . Por lo tanto, un descenso en la actividad H^+ -ATPasa puede provocar un aumento de la concentración intracelular de H^+ , y en consecuencia un descenso en el potencial de membrana con la consiguiente inhibición de la entrada de K^+ en la célula. Teniendo en cuenta estos hechos cabía la posibilidad de que la inactivación del transportador de K^+ observada en nuestros

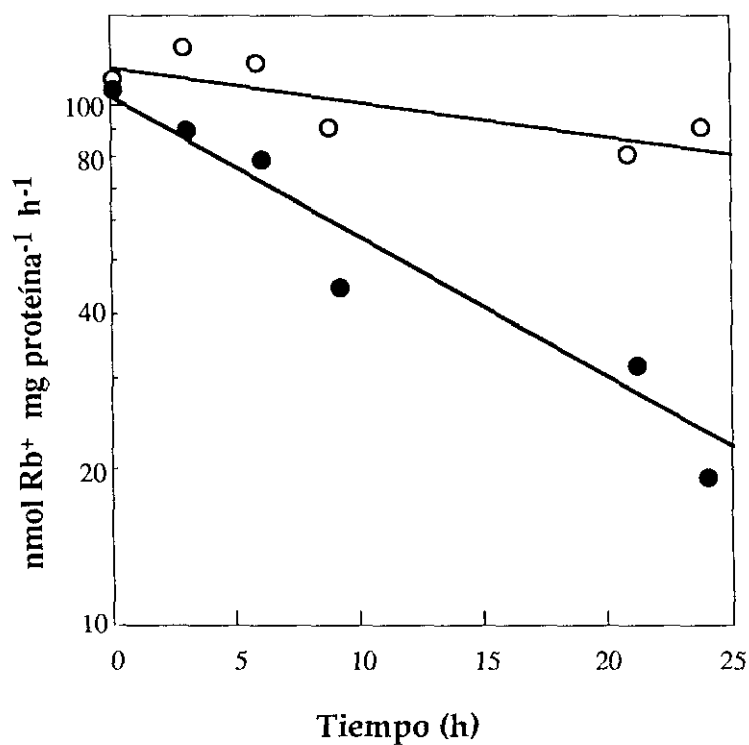


Figura 5. Efecto de la antimicina sobre la inactivación del transportador de K⁺. Las células se crecieron a 30°C en medio mínimo con etanol al 2%. A mitad de la fase exponencial de crecimiento se transfirieron a un volumen 3 veces superior de medio fresco en presencia de 2% de etanol, 10 μg/ml de cicloheximida y en ausencia (●) y presencia (○) de 10 μg/ml de antimicina A. A los tiempos indicados se tomaron muestras y se valoró el transporte de K⁺. Los datos corresponden a la media de dos experimentos.

experimentos fuera debida, no a una inactivación propiamente dicha de este transportador, sino a una inactivación de la H⁺-ATPasa que disminuyera apreciablemente el potencial de membrana. De hecho, se ha descrito (Benito *et al*, 1991) una inactivación de dicha proteína en condiciones similares a las utilizadas en nuestros experimentos. Parecía por lo tanto aconsejable investigar si la actividad de esta enzima estaba o no disminuída en nuestras condiciones experimentales.

Observamos que cuando levaduras creciendo en un medio con glucosa se recogían en fase exponencial de crecimiento y se resuspendían en medio fresco en presencia de cicloheximida, se producía un descenso en la actividad de la H⁺-ATPasa (Fig. 6) que seguía una cinética de primer orden y sugería una vida media para esta proteína de unas 9 horas. Recordemos que en estas mismas condiciones la vida media del transportador de K⁺ era de tan sólo 3.5 horas. Por lo tanto, observamos que la inactivación de la H⁺-ATPasa era mucho más lenta que la del transportador de K⁺. A pesar de ello, no podíamos descartar el hecho de que pequeños cambios en la actividad de esta enzima tuviesen un gran efecto sobre la actividad de dicho transportador. De hecho Vallejo y Serrano (1989) habían descrito que mutantes que tenían reducida la expresión del gen *PMA1*, que codifica la H⁺-ATPasa de levadura, presentaban disminuídos en un 99% la actividad de dos transportes dependientes del potencial de membrana, el transporte de leucina y el de histidina. Hay que añadir sin embargo que la actividad de otros transportes activos como el de metilamina, que es un sustrato no metabolizable de la permeasa de amonio, y el del ácido 2-aminoisobutírico, que es un sustrato no metabolizable de varias permeasas de aminoácidos, no estaban apenas afectados en estos mutantes. Parece por tanto que no todos los sistemas de transporte dependientes de energía en levadura responden por igual ante los mismos cambios en el potencial de membrana. Para averiguar en qué medida el transportador de K⁺ se veía afectado por el descenso en la actividad ATPasa que se ha detectado en nuestras condiciones experimentales, utilizamos dos cepas mutantes (Tabla 1) que expresan un menor contenido de dicha enzima y, por tanto, presentan una menor actividad ATPasa.

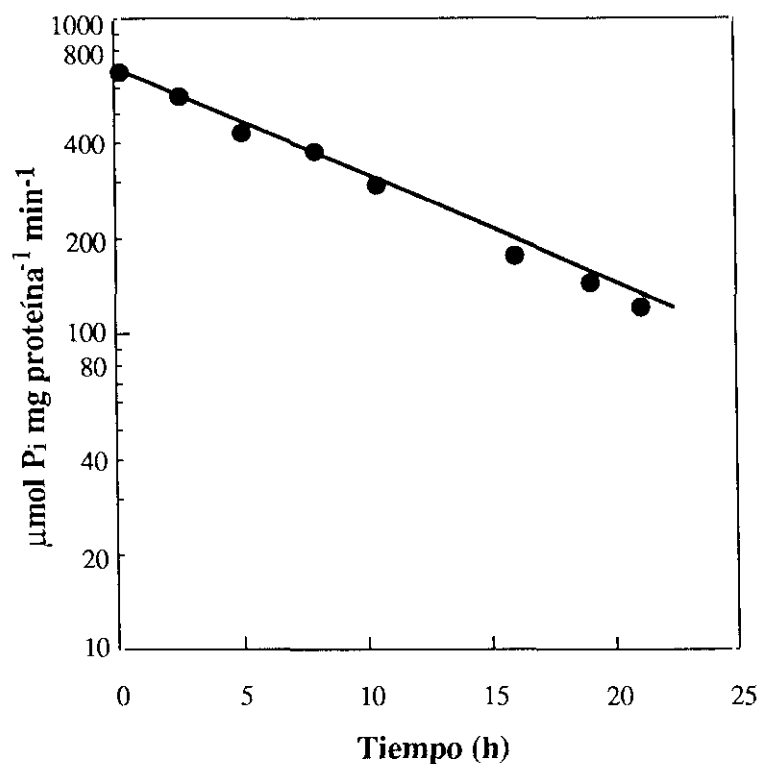


Figura 6. Inactivación de la H⁺-ATPasa en presencia de un sustrato fermentable. Las células se crecieron a 30°C en un medio mínimo en presencia de glucosa al 2%. A mitad de la fase exponencial de crecimiento se transfirieron a un volumen 3 veces superior de medio fresco en presencia de glucosa al 2%, 10 μg/ml de cicloheximida y 250 μg/ml de clorhidrato de tetraciclina. Se incubaron a 30°C y a los tiempos indicados se recogieron alícuotas, se obtuvo la fracción de membranas crudas (Métodos 2.5) y se valoró la actividad de la H⁺-ATPasa tras su activación con glucosa como se describe en Métodos 2.6.1. Los datos corresponden a la media de al menos dos experimentos.

En estas cepas se midió la actividad de la H⁺-ATPasa y del transportador de K⁺ y los resultados se muestran en la Tabla 3. En ella se observa que un descenso de aproximadamente el 60% en la actividad ATPasa provocó un descenso de la actividad del transporte de K⁺ de tan sólo un 25%, lo que indica que un gran descenso en la actividad H⁺-ATPasa provoca un pequeño descenso en la actividad del transportador de K⁺ (Fig. 4). Este hecho sugiere que la pequeña inactivación de la H⁺-ATPasa (Fig. 6) detectada durante los experimentos con el transportador de K⁺ no puede dar cuenta de la elevada inactivación observada en el caso de este transportador (Fig. 4).

Los experimentos que acabo de describir se realizaron en presencia de glucosa como fuente de energía. Si en vez de este azúcar la fuente de carbono presente en el medio era etanol, la inhibición de la síntesis de proteínas producía un descenso en la actividad de la H⁺-ATPasa mucho más rápido. Los resultados obtenidos indican una vida media para la H⁺-ATPasa en presencia de etanol de tan sólo 7 horas (Fig. 7). La naturaleza de esta rápida inactivación de la ATPasa ha sido ya elucidada en nuestro laboratorio (Amigo *et al*, 1993). En las mismas condiciones la vida media del transportador de K⁺ fue mayor de 15 horas (Fig. 4). Estos experimentos han puesto de manifiesto que en presencia de etanol la inactivación de la H⁺-ATPasa ocurre más rápidamente que la del transportador de K⁺ y por lo tanto que, en este caso, la pérdida de actividad de este enzima podría ser en parte responsable de la inactivación del transportador de K⁺.

1.4. Discusión.

Los resultados obtenidos muestran que el sistema de transporte de K⁺ está sujeto a un proceso de inactivación catabólica que presenta las siguientes características: (i) se detecta tras la inhibición de la síntesis de proteínas; (ii) sigue una cinética de primer orden; (iii) parece ser debido a cambios de la V_{max}; (iv) es dependiente de energía; (v) es estimulada por la presencia de un sustrato fermentable. Que la inactivación es consecuencia de un cambio en el propio transportador y no una disminución del potencial de membrana debido a cambios en la actividad

Tabla 3. Efecto de la disminución de la actividad H⁺-ATPasa sobre la actividad del transportador de K⁺.

Cepas	ATPasa		Transporte de K ⁺	
	$\mu\text{mol P}_i \text{ mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$	% actividad	$\text{nmol Rb}^+ \text{ mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$	% actividad
RS-514	0.450	"100"	61	"100"
RS-515	0.189	42	45.75	75
RS-516	0.166	37	43.92	72

Las células se crecieron a 30°C en medio YNBw (Materiales 1.3.1.3.), Mes-Tris pH 6.5, suplementado con los aminoácidos necesarios, en presencia de glucosa al 2%. A mitad de la fase exponencial de crecimiento, se tomaron alícuotas y se valoró la actividad ATPasa en la fracción de membranas crudas y el transporte de K⁺ en células enteras. Las actividades se refieren a mg de proteína. Los datos corresponden a la media de dos experimentos.

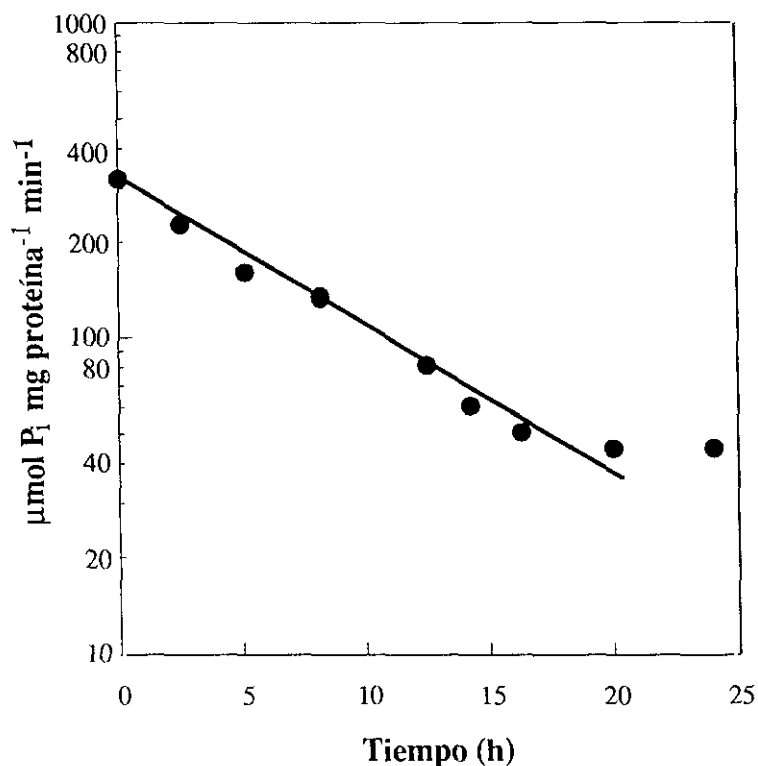


Figura 7. Inactivación de la H⁺-ATPasa en presencia de un sustrato no fermentable.

Las células se crecieron a 30°C en un medio mínimo en presencia de glucosa al 2%. A mitad de la fase exponencial de crecimiento se transfirieron a un volumen 3 veces superior de medio fresco en presencia de etanol al 2%, 10 μg/ml de cicloheximida y 250 μg/ml de clorhidrato de tetraciclina. Se incubaron a 30°C y a los tiempos indicados se recogieron alícuotas, se obtuvo la fracción de membranas crudas y se valoró la actividad de la H⁺-ATPasa tras su activación con glucosa. Los datos corresponden a la media de al menos dos experimentos.

H⁺-ATPasa ha sido demostrado en este trabajo mediante el uso de mutantes que expresan bajos niveles de esta enzima.

Las características de la inactivación del sistema de transporte de K⁺ son semejantes a las que presenta la inactivación de otros transportadores de membrana plasmática, concretamente los transportadores de azúcares (Busturia y Lagunas, 1985; Busturia y Lagunas, 1986; DeJuan y Lagunas, 1986). Este hecho sugiere fuertemente que la así llamada inactivación catabólica de las proteínas de membrana plasmática no es un proceso de control específico del metabolismo sino un fenómeno que podría afectar a un gran número de proteínas de este compartimento celular. Por otra parte, las características que en todos los casos estudiados presenta esta inactivación sugieren que podría ser debida a una proteólisis. Durante el desarrollo de este trabajo se ha demostrado en este laboratorio que al menos en el caso de dos de estas proteínas, el transportador de maltosa (Lucero *et al*, 1993) y la H⁺-ATPasa (Benito *et al*, 1991), su inactivación es de hecho debida a proteólisis. A esta conclusión se ha llegado mediante el uso de anticuerpos policlonales contra estas dos proteínas. Por lo tanto, parece muy posible que la inactivación de los transportadores de membrana plasmática observada durante la inhibición de la síntesis de proteínas, sea simplemente consecuencia de una estimulación general del recambio de las proteínas. El recambio sería más patente en el caso de proteínas de este compartimento celular debido a una menor estabilidad.

Si la inactivación del transportador de K⁺ es debida o no a proteólisis no ha podido ser demostrada porque aún no disponemos de anticuerpos contra esta proteína. Sin embargo, existen indicios que apoyan esta posibilidad. Se ha visto que el gen *TRK1*, que codifica una de las proteínas que participa en el transporte de K⁺, presenta secuencias que se sabe están implicadas en la degradación rápida de proteínas (Anderson *et al*, 1991). Una de estas secuencias, la secuencia PEST, es una región rica en prolina (P), ácido glutámico (E), serina (S) y treonina (T) flanqueada por aminoácidos con carga positiva, como histidina, arginina y lisina. Otra señal presente en la secuencia de *TRK1* y que también se ha relacionado con la rápida degradación de proteínas es la abundancia de pares de arginina (Rogers *et al*, 1986).

Pues bien, la Trk1p contiene 3 secuencias PEST y 6 pares de arginina y la posible degradación del transportador de K^+ ocurrida durante la inactivación catabólica podría estar mediada por estas señales. Las regiones PEST se han encontrado en algunas proteínas de vida media corta. También se han encontrado regiones que tienen una gran homología con las secuencias PEST en las secuencias de aminoácidos de los transportadores de azúcares (Bisson *et al*, 1993; Szkutnicka *et al*, 1989). Se ha postulado que estas regiones pueden convertirse en regiones PEST efectivas mediante la fosforilación de residuos de serina o treonina, por alguna serina/treonina kinasa de levaduras (Szkutnicka *et al*, 1989). Aún no se conocen los mecanismos por los que estas secuencias marcan a una proteína para su degradación ni tampoco a través de qué vía se lleva a cabo esta proteólisis. Se sabe que algunas de las proteínas que contienen secuencias PEST son degradadas vía ubiquitina (Hershko y Ciechanover, 1992) aunque también se ha postulado que esta degradación estaría mediada por proteasas activadas por iones Ca^{2+} , las calpaínas (Rogers *et al*, 1986; Anderson *et al*, 1991).

1.5. Conclusiones.

Los experimentos mostrados en esta parte del trabajo sugieren las siguientes conclusiones.

- 1) El transportador de K^+ se inactiva al inhibir la síntesis de proteínas. Esta inactivación tiene las siguientes características:
 - Se debe a cambios en la V_{max} .
 - Presenta una cinética de primer orden.
 - Es un proceso dependiente de energía.
 - Se estimula por la presencia en el medio de un sustrato fermentable.
- 2) La inactivación parece ser debida a cambios en el propio sistema de transporte y no a un descenso del potencial de membrana ocurrido como consecuencia de una pérdida de actividad ATPasa.

- 3) Las características de la inactivación sugieren que puede ser debida a la proteolisis del transportador.

2. EFECTO DE LA PROTEINA KINASA DEPENDIENTE DE cAMP EN LA INACTIVACION CATABOLICA DE LOS TRANSPORTADORES DE AZUCARES.

Se ha propuesto que la inactivación catabólica de los transportadores de glucosa y galactosa requiere actividad de la proteína kinasa dependiente de cAMP (Ramos y Cirillo, 1989). Además, se ha visto que en mutantes en los que la actividad de la PKA está descontrolada la expresión de estos transportadores no existe o está muy disminuída. Iniciamos esta parte del trabajo para averiguar si la inactivación y la expresión del sistema de transporte de maltosa presentaban requerimientos similares. Los resultados obtenidos con este sistema de transporte nos hicieron revisar los resultados previamente publicados en cuanto a la inactivación de los sistemas de transporte de glucosa y galactosa.

2.1. Actividad PKA de las cepas utilizadas.

En este trabajo hemos utilizado dos grupos de mutantes.

a) Mutantes que expresan la subunidad reguladora normal, cepas *BCY1*. En este caso empleamos cepas que sólo expresan uno de los genes *TPK*. La actividad PKA que presentan depende del gen *TPK* que expresan.

b) Cepas que expresan el gen *BCY1* interrumpido, cepas *bcy1*. Estos mutantes han perdido la capacidad de ser regulados por cAMP y por tanto la actividad PKA no varía en presencia o ausencia de este nucleótido. En este caso empleamos un mutante que sólo expresa *TPK1* y otro mutante que expresa el alelo *tpk1^w*. La mutación *tpk1^w* fue aislada como supresora del fenotipo presentado por los mutantes *bcy1* y se caracteriza por tener baja actividad PKA (Cameron *et al*, 1988).

El genotipo y la procedencia de las cepas empleadas se describe en la tabla 1. Cuando se comprobaron las auxotrofías y el crecimiento en maltosa (Métodos 2.1.2.1) se observó que ninguna de estas cepas era capaz de utilizar este azúcar como fuente de carbono. Por tanto se transformaron, como se indica en Métodos 2.9.3, con el plásmido pRM1.1 (Materiales 1.4.3.)

que lleva los genes necesarios para el transporte y la hidrólisis de maltosa.

En estos mutantes y en sus correspondientes cepas silvestres se midió actividad PKA. Los resultados obtenidos (Tabla 4) muestran que las cepas que sólo expresan *TPK1* o *TPK2* presentan aproximadamente un 40% de la actividad PKA de la cepa silvestre y que las cepas que sólo expresan *TPK3* o *tpk1^w* presentan una actividad PKA muy baja, aproximadamente un 5% de la actividad de una cepa silvestre. Los resultados también muestran que, como era de esperar, las cepas que expresan la subunidad reguladora funcional son sensibles a la ausencia de cAMP mientras que en las cepas que llevan el gen *BCY1* interrumpido la actividad PKA es independiente de esta variable.

2.2. Efecto de la PKA en la expresión del transportador de maltosa.

Para investigar si la ausencia de una subunidad reguladora funcional de la PKA afectaba o no a la expresión del transportador de maltosa utilizamos dos mutantes *bcy1* y su correspondiente cepa silvestre isogénica. Estos mutantes no expresan todas las subunidades catalíticas de PKA por lo que la actividad de la enzima además de no estar regulada por cAMP, era de tan sólo el 40% y el 5% respectivamente de la actividad en la cepa silvestre (Tabla 4). Este hecho nos permitió también investigar si el nivel de actividad de la enzima afectaba o no a la expresión del transportador. Los resultados obtenidos indican que el nivel de expresión del transportador fue similar en las tres cepas ensayadas. Este hecho se deduce de la observación de la intensidad de la banda correspondiente al transportador (Fig. 8A) y también de la medida cuantitativa de dicha intensidad (Fig. 8B). Un aumento de proteína en el inmunoensayo produjo un aumento lineal de la intensidad de la banda (Fig. 8B) y la pendiente de las rectas fue la misma en las tres cepas usadas. Estos resultados indican que la expresión del transportador de maltosa en levadura es independiente tanto de la presencia de la subunidad reguladora funcional de la PKA como de la capacidad de fosforilación de dicho enzima.

Tabla 4. Actividad PKA de las cepas empleadas.

Cepas	Genotipo relevante	Actividad PKA (nmol P _i mg proteína ⁻¹ min ⁻¹)	
		+cAMP	-cAMP
W303-1A	<i>TPK1 TPK2 TPK3 BCY1</i>	3.50	0.34
MB23	<i>TPK1 tpk2 tpk3 BCY1</i>	1.20	0.25
MB13	<i>tpk1 TPK2 tpk3 BCY1</i>	1.20	0.14
MB12	<i>tpk1 tpk2 TPK3 BCY1</i>	0.14	0.07
238	<i>TPK1 TPK2 TPK3 BCY1</i>	2.00	0.29
242	<i>TPK1 tpk2 tpk3 bcy1</i>	1.30	1.20
243	<i>tpk1^w tpk2 tpk3 bcy1</i>	0.14	0.12

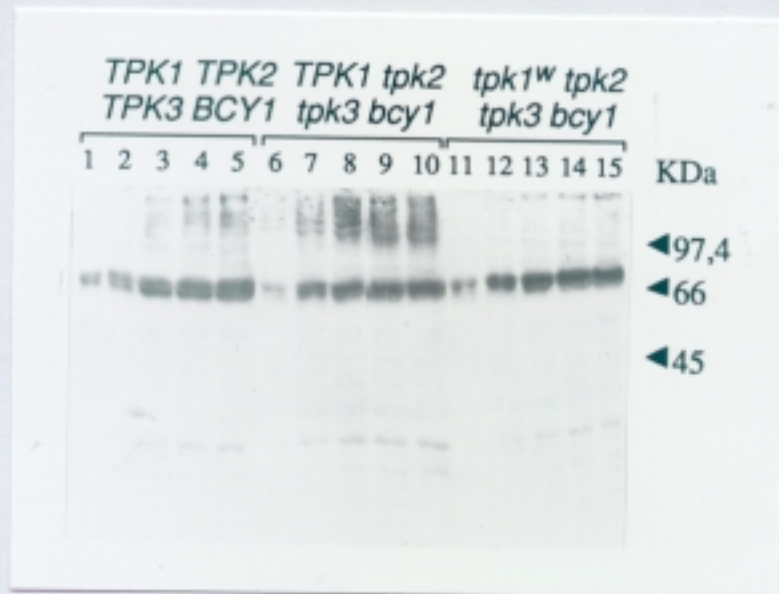
Las células se crecieron a 30°C en medio YP (Materiales 1.3.1.4.) con maltosa al 2% y 3 ppm de antimicina A. A mitad de la fase exponencial de crecimiento, se recogieron por centrifugación a 5000 rpm durante 3 minutos alícuotas de aproximadamente 25 mg de proteína y en ellas se valoró la actividad PKA (Métodos 2.6.2.) en ausencia y en presencia de 10 µM de cAMP. Los datos corresponden a la media de dos experimentos.

Figura 8. Expresión del transportador de maltosa en mutantes en la subunidad reguladora de la PKA.

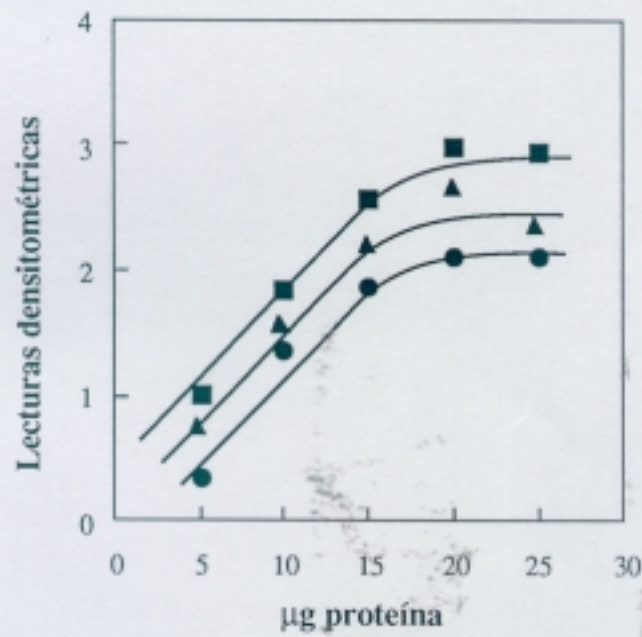
A. Las células se crecieron a 30°C en medio YP con maltosa al 2% y 3 ppm de antimicina A. A mitad de la fase exponencial de crecimiento, se transfirieron a un volumen 3 veces superior de medio mínimo sin amonio (Materiales 1.3.1.5) con glucosa al 2% y 250 µg/ml de clorhidrato de tetraciclina (Métodos 2.2). En ese momento (células no inactivadas) se recogió una alícuota de cultivo y se obtuvo un extracto crudo de las células (Métodos 2.5.). Alícuotas de estos extractos se trataron como se indica en Métodos 2.8.1.3 y se aplicaron a un gel del 10% SDS-poliacrilamida. Tras el desarrollo de la electroforesis (Métodos 2.8.1.4) y la transferencia de las proteínas del gel a papel de nitrocelulosa (Métodos 2.8.2) el transportador de maltosa se detectó empleando un anticuerpo policlonal frente a ese transportador y un segundo anticuerpo acoplado a fosfatasa alcalina (Métodos 2.8.3.). Los carriles 1 al 5, 6 al 10 y 11 al 15 contienen respectivamente 5, 10 15, 20 y 25 µg de proteína. A la derecha se indican los pesos moleculares de algunos de los marcadores utilizados.

B. Representación en unidades arbitrarias de la densitometría de las bandas correspondientes al transportador de maltosa. (■) *TPK1 TPK2 TPK3 BCY1*, (▲) *TPK1 tpk2 tpk3 bcy1*, (●) *tpk1^w tpk2 tpk3 bcy1*.

A



B



2.3. Efecto de la PKA en la inactivación catabólica del transportador de maltosa.

Para averiguar si la inactivación catabólica del transportador de maltosa requiere actividad PKA medimos la inactivación de este transportador en todas las cepas descritas en el apartado 2.1, cuya actividad PKA como hemos visto oscila entre el 5 y el 100% de la actividad normal de una cepa silvestre. Observamos (Fig. 9 y 10) que en todas los casos al someter las células a condiciones de inactivación se produjo un descenso en la actividad del transportador de maltosa que seguía una cinética de primer orden y que ocurría a la misma velocidad independientemente de la actividad PKA presente en las células así como también de la presencia o no de una subunidad reguladora funcional. De los resultados mostrados en las figuras 9 y 10 se deduce que la vida media del transportador de maltosa en todas las cepas ensayadas fue de aproximadamente 1 hora y por lo tanto se puede concluir que la fosforilación por PKA no está implicada en su inactivación catabólica. En experimentos realizados en paralelo se comprobó si las diferencias en la actividad PKA de las cepas se mantenía durante los experimentos de inactivación o si por el contrario desaparecía. La desaparición de las diferencias hubiera invalidado la conclusión alcanzada. Para ello se midió la actividad PKA de las cepas inmediatamente después de someter las células a condiciones de inactivación y transcurridas 3 horas en estas condiciones. Los resultados obtenidos mostraron que las diferencias en actividad PKA de las cepas se mantenía constante durante el proceso de inactivación (Tabla 5).

2.4. Efecto de la PKA en la degradación del transportador de maltosa.

Paralelamente al desarrollo de este trabajo se demostró en nuestro laboratorio que la inactivación catabólica del transportador de maltosa es debida a su proteolisis (Lucero *et al*, 1993). De acuerdo con esto la inactivación que habíamos detectado y que se muestra en las figuras 9 y 10, debería ir acompañada de un descenso en el contenido celular del transportador. Para probar esta hipótesis seguimos la disminución de su contenido en dos mutantes que tienen respectivamente una actividad PKA de un 40 y un 5% con respecto a la cepa silvestre (Tabla 4).

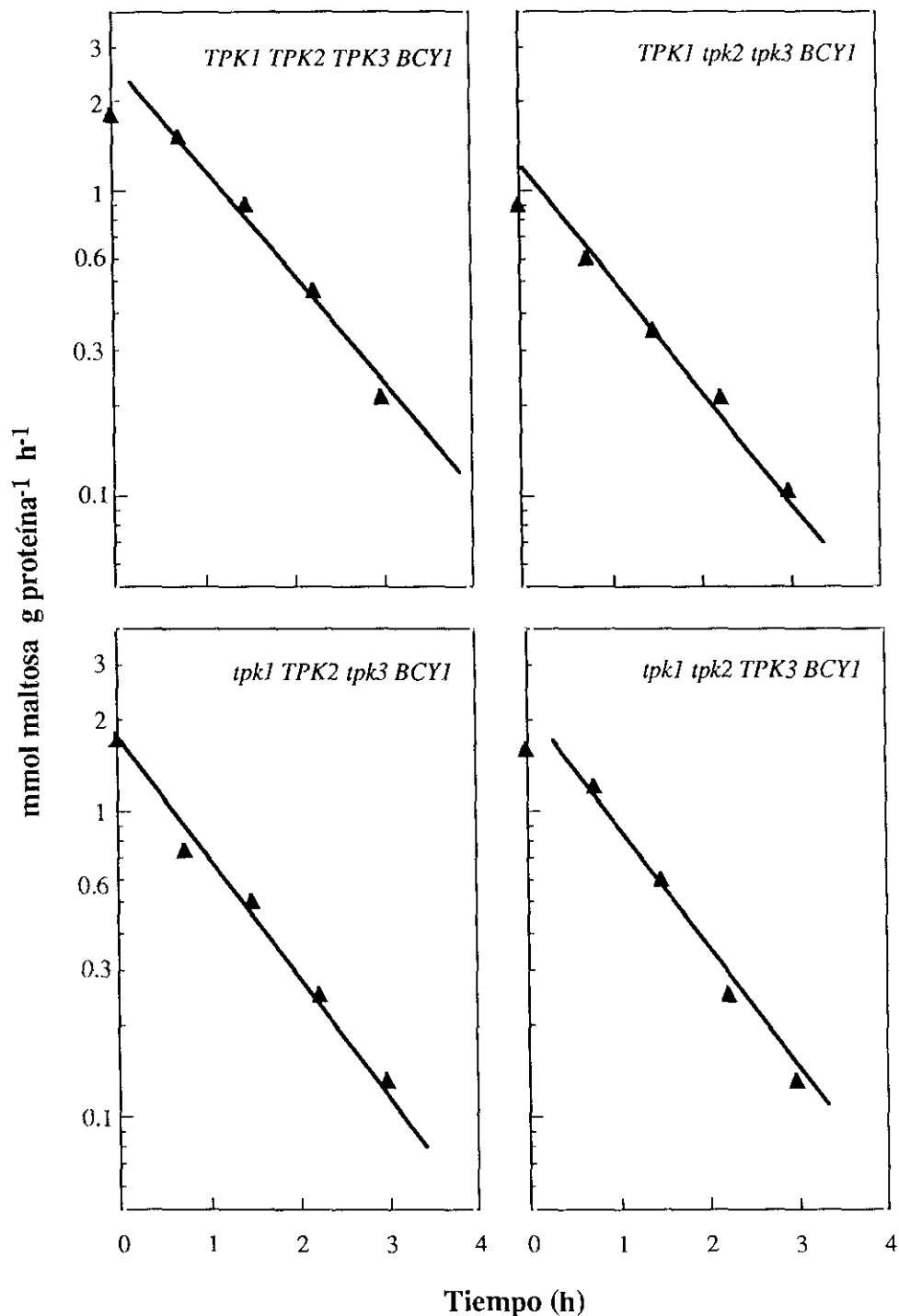


Figura 9. Inactivación catabólica del sistema de transporte de maltosa en mutantes defectivos en actividad PKA que expresan *BCY1*.

Las células se crecieron a 30°C en medio YP con maltosa al 2% y 3 ppm de antimicina A. A mitad de la fase exponencial de crecimiento se transfirieron a un volumen 3 veces superior de medio mínimo sin amonio en presencia de glucosa al 2% y 250 µg/ml de clorhidrato de tetraciclina. Se incubaron a 30°C y a los tiempos indicados se recogieron alícuotas y se valoró el transporte de maltosa (Métodos 2.3.1.3). Los datos corresponden a la media de dos experimentos.

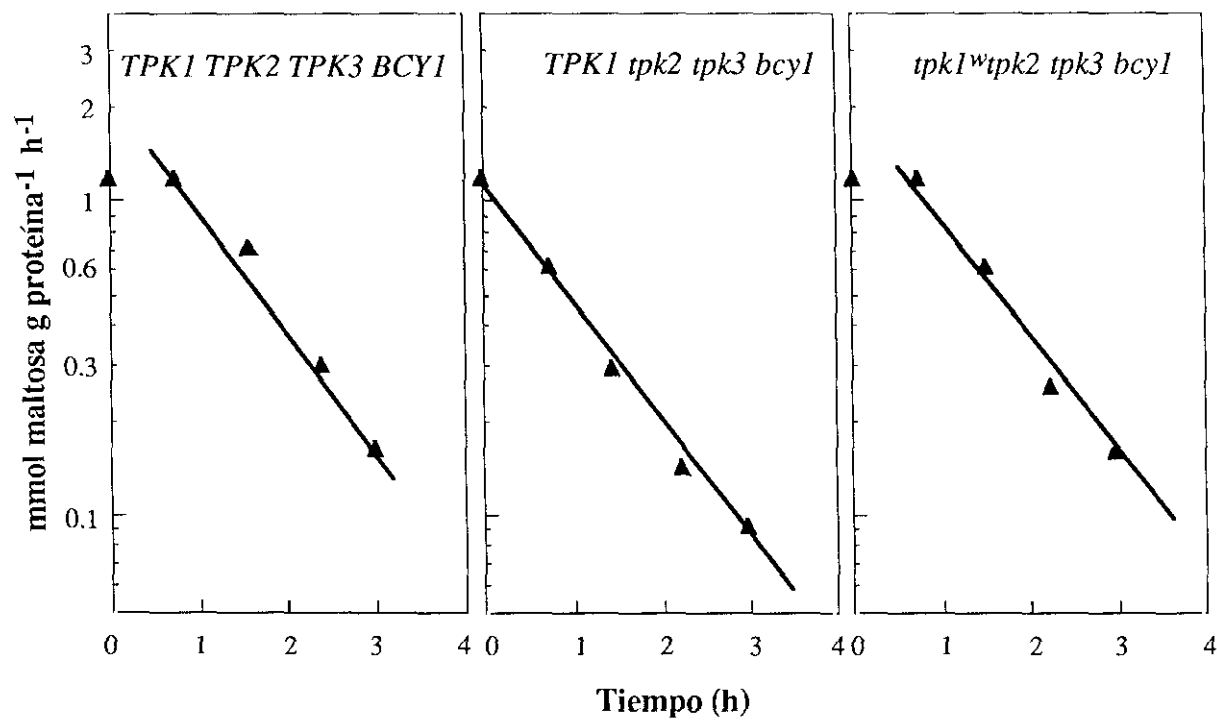


Figura 10. Inactivación catabólica del sistema de transporte de maltosa en mutantes defectivos en actividad PKA que expresan *bcy1*.

El experimento se realizó como se describe en la figura 9.

Tabla 5. Estabilidad de la actividad PKA tras 3 horas de incubación en condiciones de inactivación.

Cepas	Genotipo relevante	Actividad PKA (nmol P _i mg proteína ⁻¹ min ⁻¹)	
		0 h	3 h
W303-1A	<i>TPK1 TPK2 TPK3 BCY1</i>	3.50	3.50
MB23	<i>TPK1 tpk2 tpk3 BCY1</i>	1.20	1.24
MB13	<i>tpk1 TPK2 tpk3 BCY1</i>	1.20	1.40
MB12	<i>tpk1 tpk2 TPK3 BCY1</i>	0.14	0.20
238	<i>TPK1 TPK2 TPK3 BCY1</i>	2.00	3.20
242	<i>TPK1 tpk2 tpk3 bcy1</i>	1.30	1.00
243	<i>tpk1^w tpk2 tpk3 bcy1</i>	0.14	0.10

Las células se crecieron a 30°C en medio YP con maltosa al 2% y 3 ppm de antimicina. A mitad de la fase exponencial de crecimiento se transfirieron a un volumen 3 veces superior de medio mínimo sin amonio en presencia de glucosa al 2% y 250 µg/ml de clorhidrato de tetraciclina. Se incubaron a 30°C y en ese momento y también tras tres horas de incubación se recogieron alícuotas de aproximadamente 25 mg de proteína y se valoró la actividad PKA. Los datos corresponden a la media de dos experimentos.

Los resultados obtenidos mostraron que tras cuatro horas en condiciones de inactivación tanto en la cepa silvestre como en las cepas con actividad PKA disminuída tuvo lugar una disminución de la intensidad de la banda correspondiente al transportador que fue semejante en todas ellas (Fig. 11).

En resumen, todos los resultados presentados indican fuertemente que la fosforilación por PKA no interviene en la inactivación catabólica del transportador de maltosa y que esta inactivación ocurre a una velocidad que es independiente de la fosforilación por esta proteína kinasa.

2.5. Efecto de la PKA en la inactivación catabólica de los transportadores de glucosa y galactosa.

Los resultados obtenidos por nosotros sobre el efecto de la PKA en la expresión e inactivación del transportador de maltosa discrepaban de los descritos previamente en relación a los transportes de glucosa y galactosa. Como ya he mencionado anteriormente se ha descrito que la inactivación catabólica de estos transportadores requiere actividad PKA (Ramos y Cirillo, 1989). Teniendo en cuenta que la inactivación de todos los transportadores presenta características similares sorprendía el hecho de que esta inactivación presentase requerimientos de actividad PKA diferentes. Por esta razón, decidimos reexaminar los resultados obtenidos por Ramos y Cirillo.

Para ello investigamos la inactivación del transportador de glucosa en los dos grupos de mutantes PKA descritos (Tabla 4). En el caso del transportador de galactosa no se utilizaron los mutantes *bcy1* porque estas cepas mostraron ser incapaces de utilizar este azúcar. Observamos que al someter las células a condiciones de inactivación se producía un descenso en la actividad tanto del transportador de glucosa (Fig. 12 y 13) como del de galactosa (Fig. 14), a una velocidad que era igual en todas las cepas y por lo tanto, independiente tanto de la actividad PKA como de la presencia de la subunidad reguladora funcional. En todas las cepas la vida media

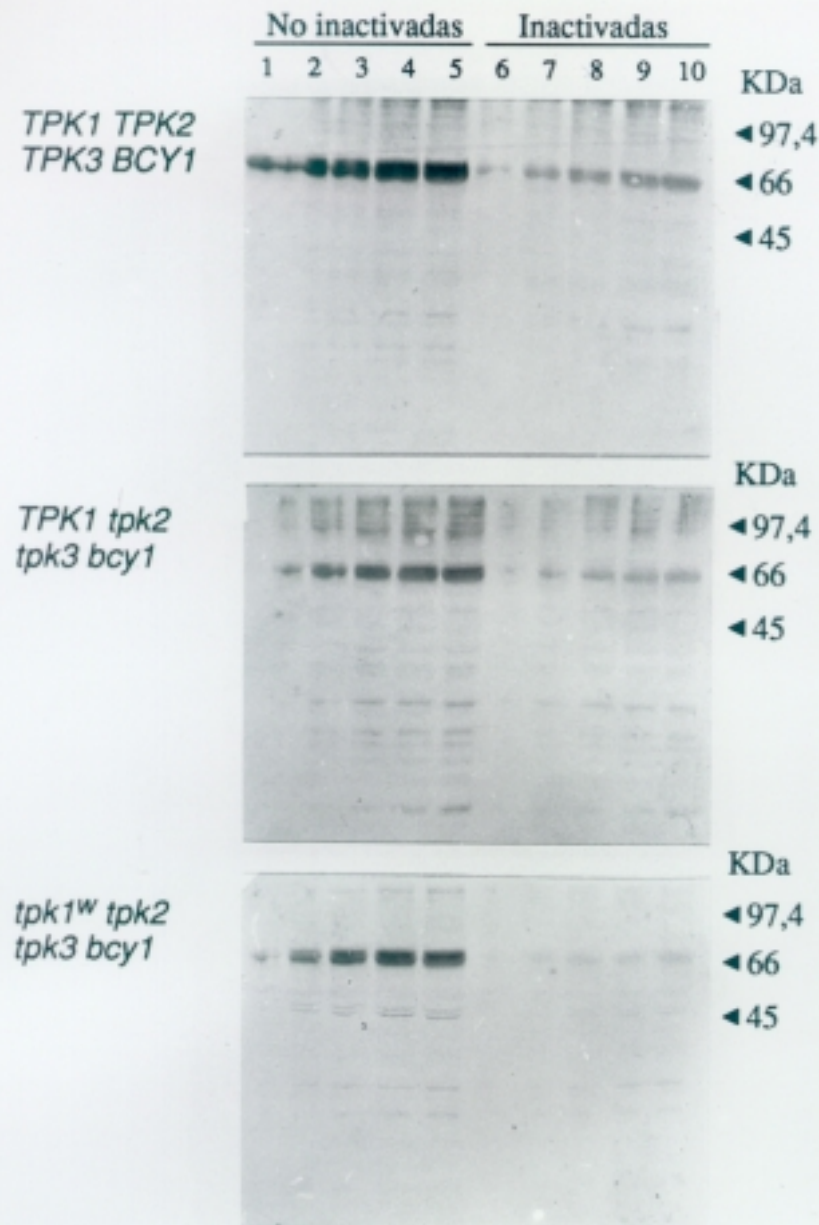


Figura 11. Contenido del transportador de maltosa durante la inactivación catabólica en cepas deficientes en PKA que expresan *bcy1*.

Las células se trataron como se indica en la figura 9. Tras suspenderlas en el medio de inactivación (células no inactivadas) y tras cuatro horas de incubación (células inactivadas) se recogieron dos alícuotas de cada cepa. En una de ellas se midió el transporte de maltosa como control de la actividad de la proteína. De la otra alícuota se obtuvo el extracto crudo de células. La inmunodetección del transportador de maltosa en estos extractos se realizó como se indica en la figura 8A. Los carriles 1 al 5 y 6 al 10 contenían 5, 10, 15, 20 y 25 μ g de proteína respectivamente. A la derecha se indican los pesos moleculares de algunos de los marcadores utilizados.

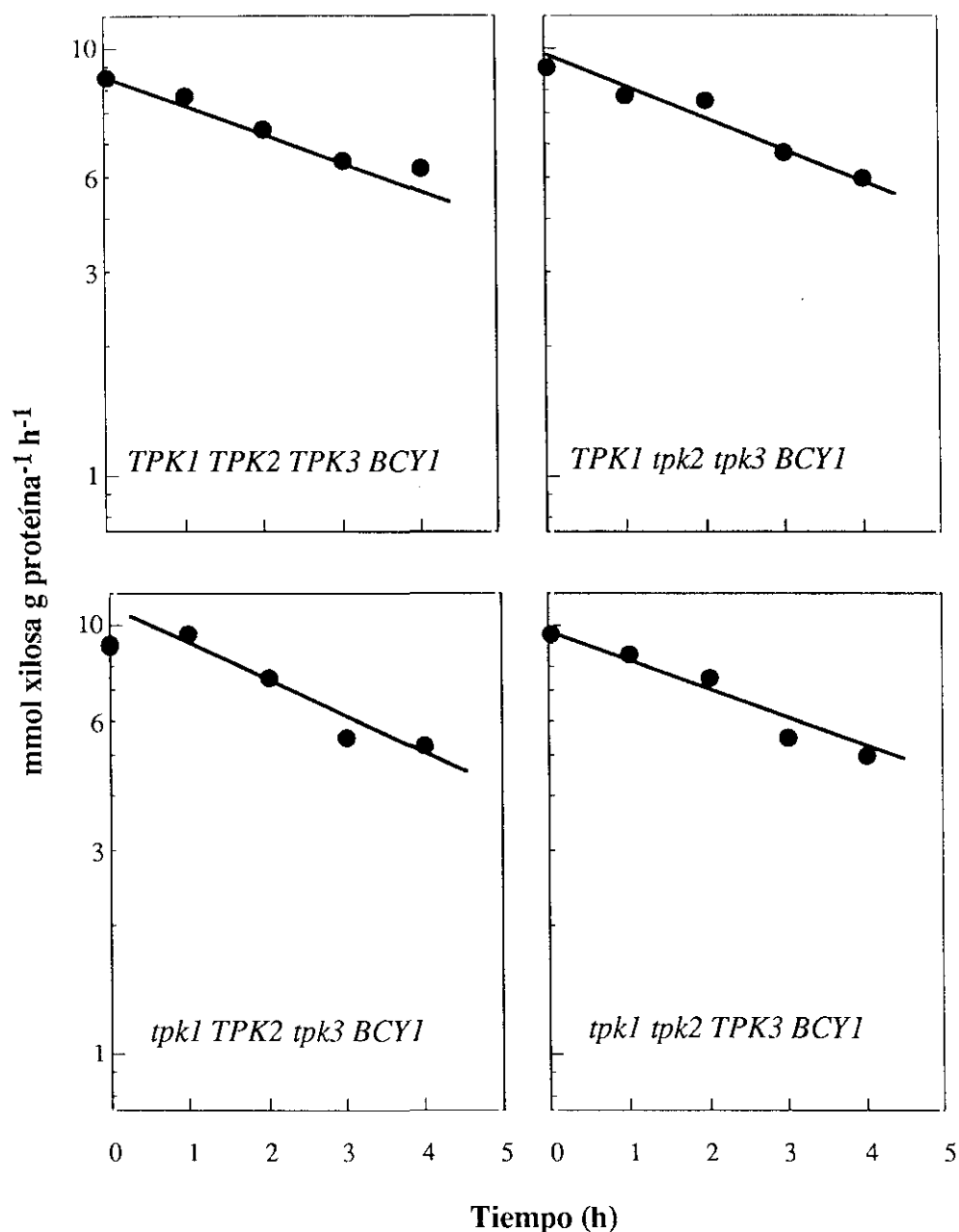


Figura 12. Inactivación del sistema de transporte de glucosa en cepas deficientes en PKA que expresan *BCY1*.

Las células se crecieron a 30°C en medio YP con glucosa al 2%. A mitad de la fase exponencial de crecimiento se transfirieron a un volumen 3 veces superior de medio mínimo sin amonio en presencia de glucosa al 2% y 250 µg/ml de clorhidrato de tetraciclina. Se incubaron a 30°C y a los tiempos indicados se recogieron alícuotas y en ellas se valoró el transporte de glucosa como se indica en Métodos 2.3.1.1. Los datos corresponden a la media de dos experimentos.

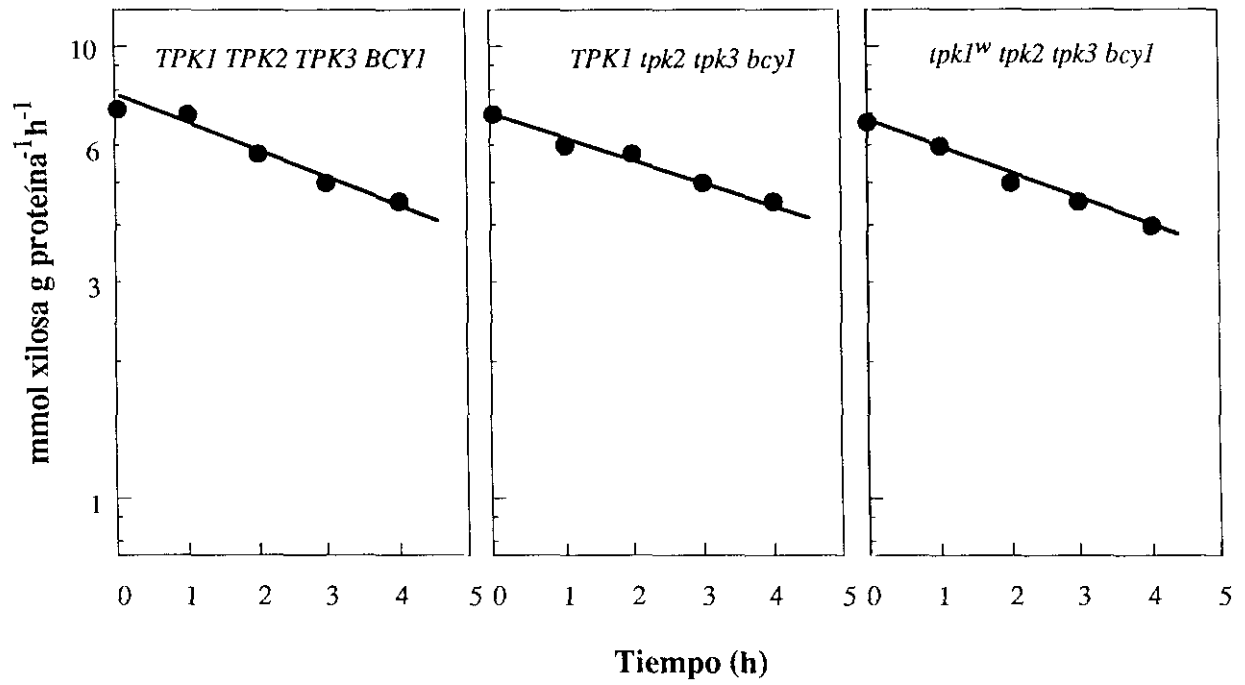


Figura 13. Inactivación del sistema de transporte de glucosa en cepas deficientes en PKA que expresan *bcy1*.

El experimento se realizó como se describe en la figura 12.

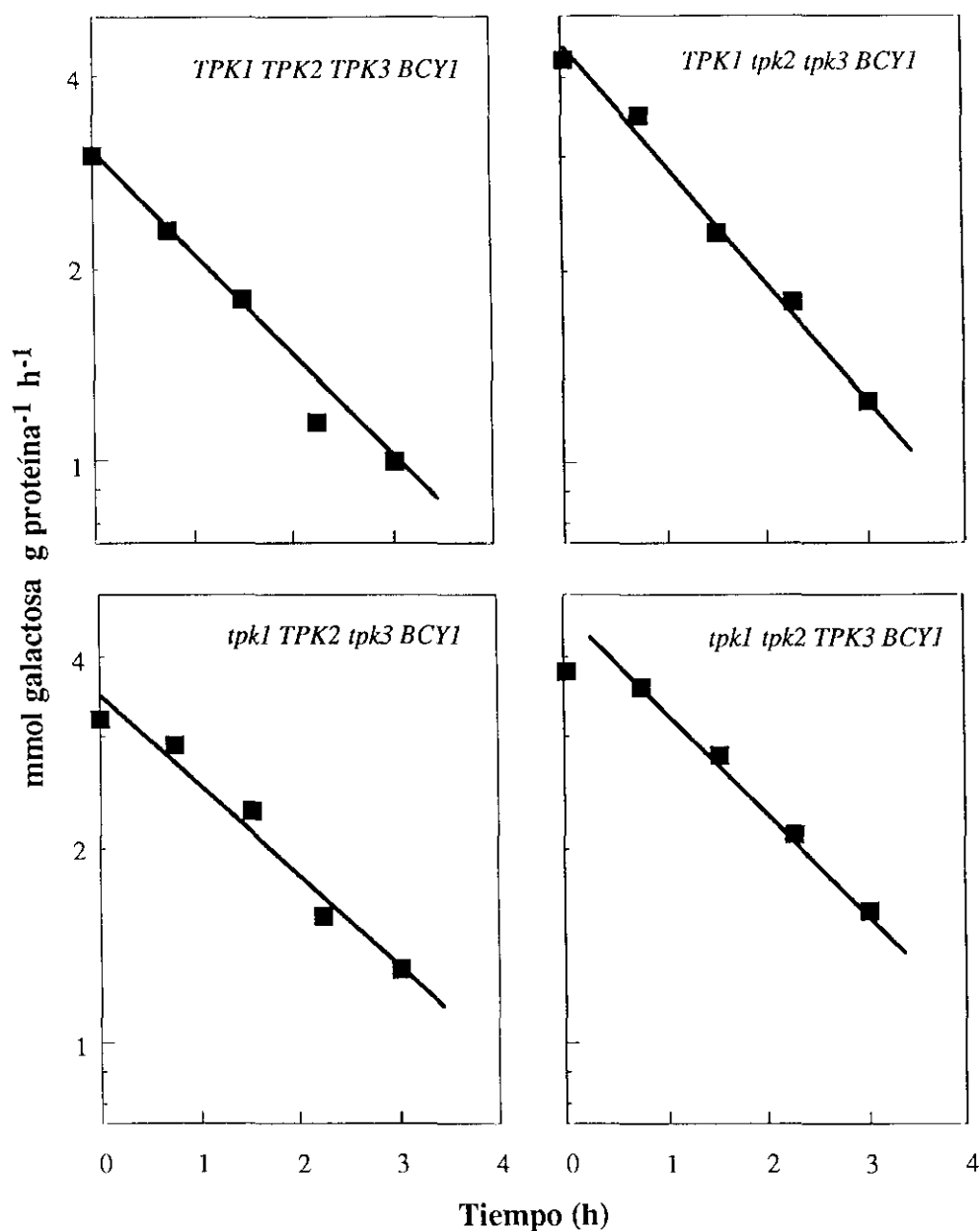


Figura 14. Inactivación del sistema de transporte de galactosa en cepas deficientes en PKA que expresan *BCY1*.

Las células se crecieron a 30°C en medio YP con galactosa al 2% y 3 ppm antimicina A. A mitad de la fase exponencial de crecimiento se transfirieron a un volumen 3 veces superior de medio mínimo sin amonio en presencia de glucosa al 2% y 250 µg/ml de clorhidrato de tetraciclina. Se incubaron a 30°C y a los tiempos indicados se recogieron alícuotas y en ellas se valoró el transporte de galactosa como se indica en Métodos 2.3.1.2. Los datos corresponden a la media de dos experimentos.

calculada a partir de los datos de estas figuras fue de unas 5 y 2 horas para los transportadores de glucosa y galactosa respectivamente. Estos resultados indican que la inactivación catabólica de estos transportadores, al igual que la del de maltosa, no depende de la actividad PKA presente en las células.

La discrepancia entre nuestros resultados y los obtenidos por Ramos y Cirillo podía ser debida a diferencias en las condiciones de inactivación utilizadas por estos autores y las nuestras. En realidad estas diferencias eran muy pequeñas puesto que se limitaban a la diferente densidad celular de los cultivos durante la inactivación. No obstante decidimos probar esta posibilidad. Para reproducir las condiciones de inactivación de Ramos y Cirillo, aumentamos la cantidad de células en el medio de inactivación, y estudiamos la desaparición de la actividad del transporte de galactosa en dos cepas que presentan un 5 y un 100% de actividad PKA respectivamente (Tabla 4). Observamos que en estas condiciones experimentales se producía un retraso en el comienzo de la inactivación del transportador (Fig. 15). Pero una vez que la inactivación comenzaba ésta transcurría a la misma velocidad en ambas cepas. La vida media calculada fue, al igual que en nuestras condiciones experimentales, de unas dos horas por lo que concluimos que las diferencias entre nuestros resultados y los previamente descritos no son debidas a las diferentes condiciones de inactivación empleadas.

2.6. Discusión.

Los resultados mostrados indican que la expresión de los transportadores de azúcares en levadura, así como también la inactivación catabólica de estas proteínas, ocurre independientemente tanto de la presencia de la subunidad reguladora funcional de la proteína kinasa dependiente de cAMP como de la actividad catalítica de esta enzima. Con los datos de que disponemos no podemos establecer la causa de la discrepancia entre nuestros resultados y los publicados previamente por otros autores (Ramos y Cirillo, 1989). Nuestros resultados indican que esta discrepancia no puede ser debida a diferencias en las condiciones de inactivación utilizadas puesto que a partir de experimentos realizados en las condiciones

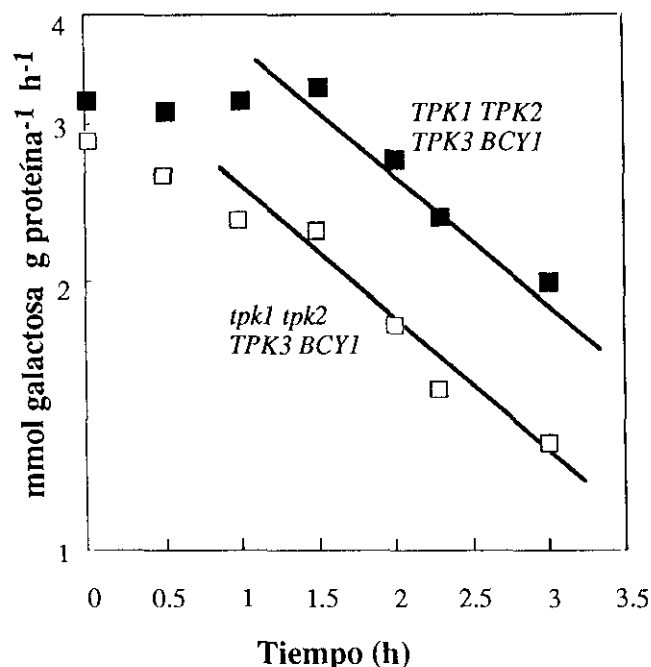


Figura 15. Inactivación del sistema de transporte de galactosa en las condiciones empleadas por Ramos y Cirillo.

Las células se crecieron a 30°C en medio YP con galactosa al 2% y 3 ppm antimicina A. A mitad de la fase exponencial de crecimiento se recogieron por centrifugación a 5000 rpm durante 3 minutos y, después de lavarlas con agua MilliQ, se suspendieron en un medio que contenía 0.67% YNBw y glucosa al 2%, para una densidad celular de 5 DO₆₄₀ nm. A los tiempos indicados se recogieron alícuotas de células en las que se valoró la actividad del transporte de galactosa. Los datos corresponden a la media de dos experimentos.

experimentales usadas por esos autores alcanzamos la misma conclusión. Una razón que podría contribuir a la mencionada discrepancia es la forma inadecuada en la que fueron realizadas las medidas del transporte en el trabajo previamente publicado (Ramos y Cirillo, 1989). En este trabajo los autores incuban las células en presencia de los sustratos naturales, glucosa y galactosa respectivamente, durante un minuto a 30°C. Ahora bien se ha demostrado que a esa temperatura y con ese tiempo de incubación una cantidad substancial del azúcar transportado puede ser secretado al medio como productos de fermentación (Serrano, 1977), lo que da lugar a un gran error en la medida del transporte. Hay que tener en cuenta que el tiempo de incubación recomendado cuando se usan sustratos naturales a 30°C es de tan sólo 5 segundos (Fuhrmann, 1992; Bisson y Fraenkel, 1983). Nuestro periodo de incubación fue de 15 segundos y la temperatura de incubación fue de tan sólo 20°C, como se describe en Métodos 2.3.1.

Todos los transportadores de azúcares identificados hasta la fecha en *S. cerevisiae* contienen posibles sitios de fosforilación por PKA (Kruckeberg y Bisson, 1990; Bisson *et al*, 1993). Aunque los resultados presentados en este trabajo indican que estos sitios de fosforilación no están implicados en la inactivación catabólica de los transportadores, no puede descartarse que estén relacionados con otros mecanismos de regulación. Por ejemplo, podrían estar implicados en los cambios rápidos y reversibles en la actividad de estos transportadores que se observan tras la desaparición de la fuente de nitrógeno en el medio o también en el cambio de aerobiosis a anaerobiosis, lo que se conoce como efecto Pasteur (Lagunas, 1993). De hecho un papel similar a éste que proponemos podría guardar relación con los sitios de fosforilación de otras proteínas como por ejemplo la fructosa-1,6-bisfosfatasa y la isocitrato liasa. Durante mucho tiempo se pensó que la degradación de estas enzimas, ocurrida durante su inactivación catabólica, estaba provocada por la fosforilación por PKA que tiene lugar durante la primera etapa de la inactivación. Sin embargo, actualmente se piensa que esta fosforilación no está implicada en esta degradación sino que es responsable del aumento de la susceptibilidad de estas enzimas a sus mecanismos de regulación alostéricos (Holzer, 1989). Sería interesante

averiguar si la fosforilación por PKA de los transportadores de azúcares juega un papel semejante al descrito en el caso de estas enzimas.

2.7. Conclusiones.

En contra de lo que otros autores han descrito:

- 1) La expresión de los transportadores de azúcares no depende de la presencia de la subunidad reguladora funcional de la proteína quinasa dependiente de cAMP.
- 2) La inactivación catabólica de estos transportadores es independiente de la actividad fosforilante de esta enzima.

3. MECANISMO DE DEGRADACION DE LAS PROTEINAS DE MEMBRANA PLASMATICA DURANTE LA INACTIVACION CATABOLICA.

Las características de la inactivación catabólica de las proteínas de membrana plasmática sugieren que esta inactivación podría ser debida a proteolisis y en los casos en los que la disponibilidad de anticuerpos lo ha permitido, esta hipótesis ha sido demostrada (Lucero *et al*, 1993; Benito *et al*, 1991). En esta parte del trabajo nos hemos propuesto investigar el compartimento celular en el que tiene lugar esta proteolisis. La degradación puede ocurrir en la propia membrana plasmática o en el interior de la célula. Para distinguir entre estas dos posibilidades hemos investigado el papel de la endocitosis en la inactivación catabólica. Posteriormente investigamos cuál de los principales sistemas de degradación de *S. cerevisiae*, el proteasoma o la vacuola, está implicado en dicho proceso.

3.1. Relación entre endocitosis e inactivación catabólica del transportador de maltosa.

Para investigar si la endocitosis está implicada en la inactivación catabólica del transportador de maltosa utilizamos las cepas con las mutaciones *end3* y *end4* (Tabla 1), que presentan endocitosis disminuída debido a una alteración en la etapa de internalización. El mutante *end3* es defectivo en la endocitosis a cualquier temperatura mientras que la mutación *end4* reduce la endocitosis principalmente a temperaturas superiores a 34°C. Se comprobó el fenotipo de estos mutantes y su crecimiento en presencia de distintos azúcares como fuente de carbono (Métodos 2.1.2) y, puesto que eran incapaces de crecer utilizando maltosa, fueron transformadas con el plásmido pRM1.1 (Materiales 1.4.3.) como se indica en Métodos 2.9.3. Observamos que cuando las células transformadas se sometían a condiciones de inactivación se producía un descenso en la actividad del transporte de maltosa que, tanto a 24 como a 35°C, ocurría mucho más lentamente en los mutantes que en la cepa silvestre (Fig. 16). De los resultados obtenidos se calculó que a 35°C la vida media del transportador en las cepas mutantes fue 6-7 veces mayor que en el silvestre (Tabla 6), mientras que a 24°C fue

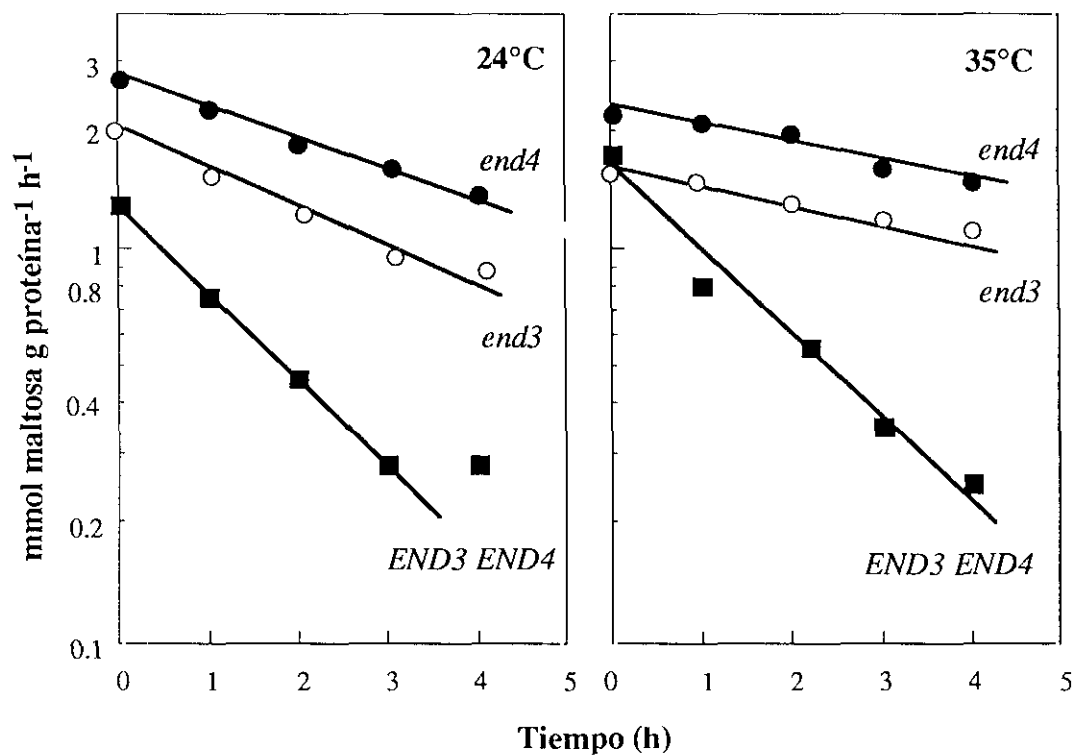


Figura 16. Inactivación del sistema de transporte de maltosa en cepas con endocitosis disminuída a 24°C y 35°C.

Las células se crecieron a 24°C en YP (Materiales 1.3.1.4) con maltosa al 2% en presencia de 3 ppm de antimicina A. A mitad de la fase de crecimiento exponencial se transfirieron a un volumen 3 veces superior de medio mínimo sin amonio (Materiales 1.3.1.5) en presencia de glucosa al 2% y 250 µg/ml de clorhidrato de tetraciclina. Se incubaron a 24°C y a 35°C y a los tiempos indicados se recogieron alícuotas y se valoró el transporte de maltosa (Métodos 2.3.1.3). Los datos corresponden a la media de al menos dos experimentos.

Tabla 6. Vida media del transportador de maltosa en cepas con endocitosis disminuída.

Cepas	Genotipo relevante	Vida media (h)		
		Actividad		Contenido
		24°C	35°C	35°C
RH144-3D	<i>END3 END4</i>	1.4	1.4	1.3
RH266-1D	<i>end3</i>	3.2	6.0	5.9
RH268-1C	<i>end4</i>	4.4	7.0	6.2

Los experimentos se realizaron como se describe en las figuras 16 y 17.

sólamente de 2-3 veces mayor (Tabla 6). Estos resultados indican que un defecto en la etapa de internalización de la endocitosis va acompañado de un defecto en la inactivación catabólica del transportador de maltosa y sugiere que ambos procesos están relacionados.

3.2. Relación entre endocitosis y degradación del transportador de maltosa.

La inactivación catabólica del transporte de maltosa es debida a la proteólisis del transportador (Lucero *et al*, 1993). Si, como se deduce de los resultados mostrados, la endocitosis está implicada en la inactivación catabólica, la degradación del transportador ocurrida durante dicha inactivación debe también estar disminuída en los mutantes afectados en endocitosis. Para probar esta hipótesis medimos el contenido de transportador a la temperatura en que los efectos de la mutación son más aparentes, esto es a 35°C (Raths *et al*, 1993). Los resultados obtenidos se muestran en la figura 17 y en ella se observa que tanto en la cepa silvestre como en los mutantes la inactivación (Fig. 16) fue acompañada de un descenso paralelo en la cantidad de la proteína. Como puede verse en la tabla 6, los valores de vida media obtenidos a partir de los datos sobre contenido de transportador fueron semejantes a los obtenidos a partir de los datos sobre actividad. Estos resultados muestran que la degradación del transportador de maltosa está relacionada con la velocidad de endocitosis y que un retraso en este proceso tiene como consecuencia un descenso en la velocidad de degradación del transportador. En resumen, la internalización del transportador es un paso necesario en su degradación.

3.3. Relación entre endocitosis e inactivación catabólica de otros transportadores.

Para comprobar si la endocitosis se halla implicada no sólo en la inactivación catabólica del transportador de maltosa sino también en la inactivación catabólica de otras proteínas de membrana, decidimos explorar el papel eventual de este proceso en la inactivación catabólica de

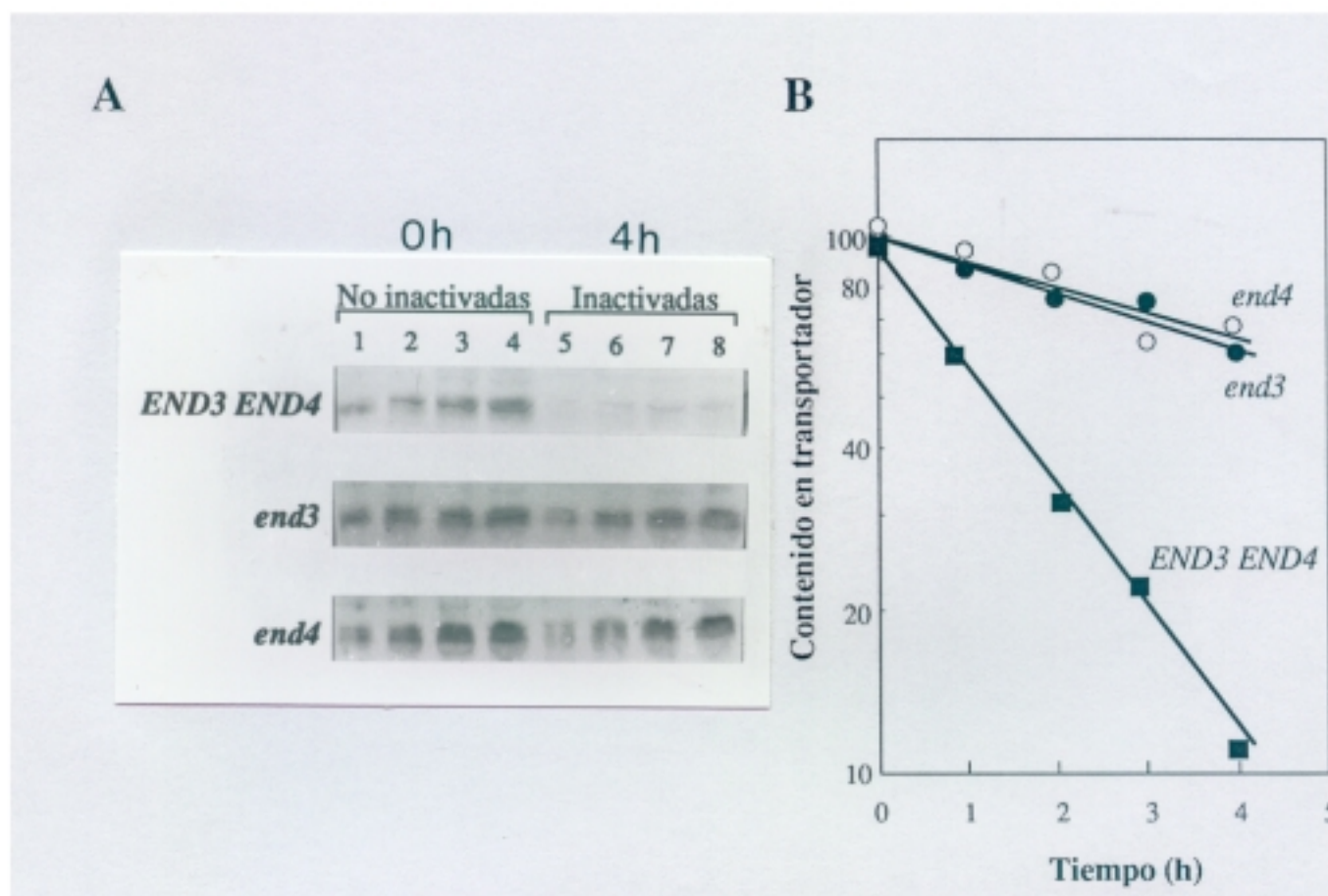


Figura 17. Contenido en transportador de maltosa durante la inactivación en cepas con endocitosis disminuída.

(A). Las células se trataron como se indica en la figura 16. Cuando se suspendieron en el medio de inactivación se incubaron a 35°C y a los tiempos indicados se recogieron alícuotas, de las que se obtuvo el extracto crudo. Alícuotas de estos extractos se trataron como se indica en Métodos 2.8.1.3 y se aplicaron a un gel del 10% de SDS-poliacrilamida. Tras el desarrollo de la electroforesis (Métodos 2.8.1.4.) y la transferencia de las proteínas del gel a papel de nitrocelulosa (Métodos 2.8.2.) el transportador de maltosa se detectó empleando un anticuerpo policlonal contra ese transportador y un segundo anticuerpo acoplado a fosfatasa alcalina (Métodos 2.8.3.). Los carriles 1 al 5 y 6 al 10 contienen de 5 a 25 µg de proteína.

(B). Representación en unidades arbitrarias de la densitometría de las bandas correspondientes al transportador de maltosa en la cepa silvestre (■), y en las mutantes *end3* (○) y *end4* (●). Los resultados corresponden a la media de dos experimentos.

los transportadores de glucosa y de K^+ . En estos experimentos intentamos utilizar también los mutantes *end3* y *end4*. Sin embargo, resultados preliminares mostraron que en este caso estos mutantes no eran apropiados. Los transportes de glucosa y K^+ tienen una vida media relativamente alta, aproximadamente 5 horas, y no fue posible evaluar de forma cuantitativa y fiable un incremento sobre ese valor. Por esa razón intentamos el uso de otras dos cepas mutantes, la 54P y la H17 (Tabla 1), también termosensibles, que presentan la mutación *ts1*, y cuyo fenotipo, a diferencia de las cepas con las mutaciones *end3* y *end4*, es un aumento en la velocidad de endocitosis. Así mismo, utilizamos la cepa TY17, obtenida por transformación con el gen silvestre *TS1* de uno de los mutantes *ts1*, en concreto H17. Se comprobó el fenotipo de estas cepas y se midió de forma cualitativa la endocitosis mediante el uso del colorante LY, como se indica en Métodos 2.4. En la figura 18 se presentan las fotografías de las células visualizadas al microscopio. Como se puede observar, las cepas con la mutación *ts1* presentaron un aumento en la captación de LY con respecto a la cepa silvestre o la transformada con *TS1*, en las que no se observó la acumulación del colorante en el interior celular.

3.3.1. Relación entre la inactivación catabólica del transportador de glucosa y la endocitosis.

Para investigar si la endocitosis está implicada en la inactivación catabólica del transportador de glucosa seguimos la velocidad de la inactivación en las cepas con endocitosis aumentada, en su correspondiente silvestre y en la cepa transformada con *TS1*. Cuando los experimentos de inactivación se realizaron a 24°C no se observaron diferencias entre las cepas y en todos los casos se observó un descenso en la actividad que siguió una cinética de primer orden y que sugiere una vida media de aproximadamente 7 horas (Figura 19). Sin embargo, cuando las células se incubaron a 35°C, la inactivación fue más rápida que a 24°C en todas las cepas estudiadas. Pero en este caso sí que se observan diferencias entre las cepas que portaban el gen *ts1* y las que portaban el *TS1* (Fig. 19). La vida media fue un 40% más bajo en las cepas mutantes que en la cepa silvestre y la cepa transformada con el gen *TS1* (Tabla 7). Esta

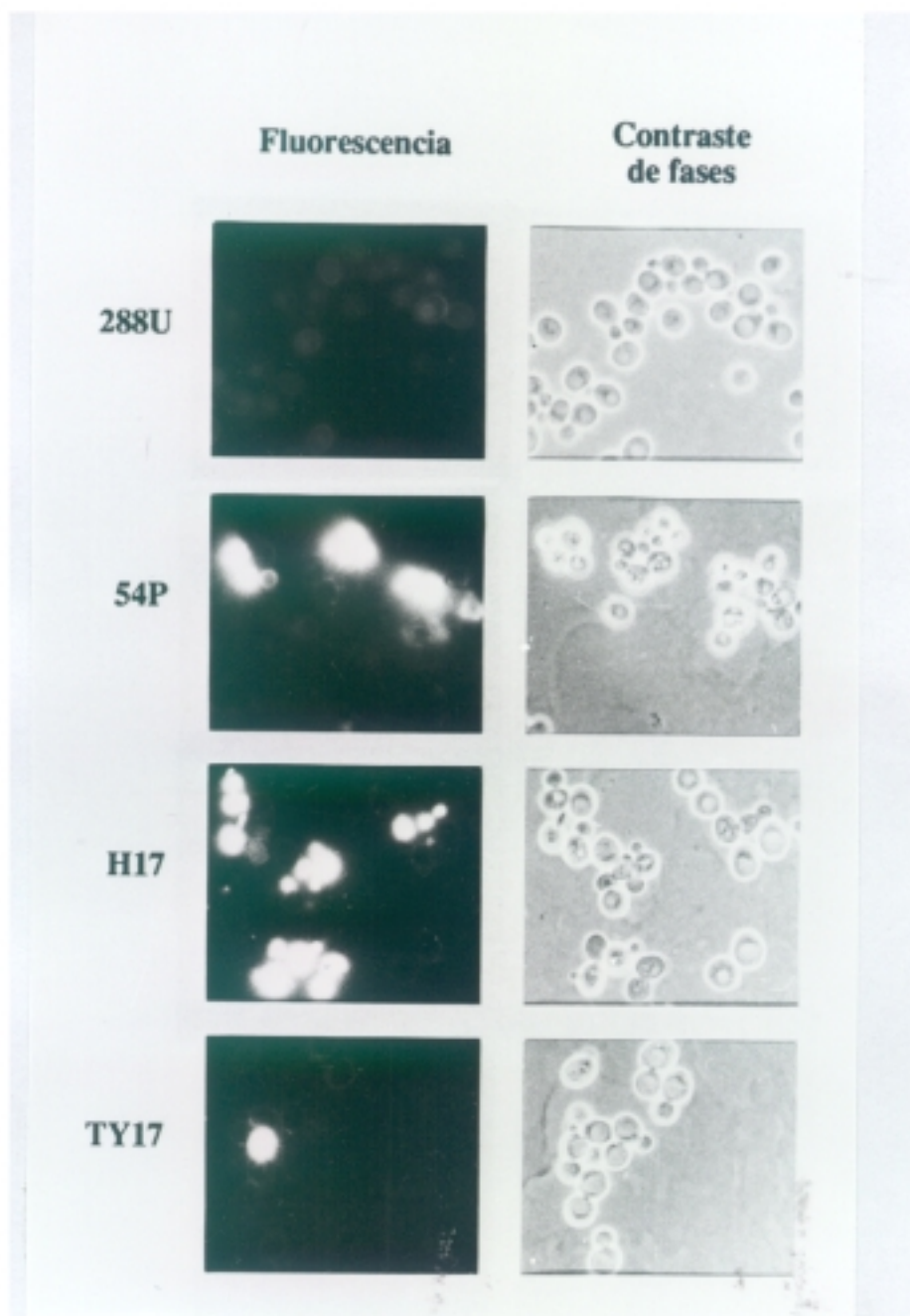


Figura 18. Acumulación de LY en cepas con endocitosis aumentada, a 35°C.

Las células se crecieron a 24°C en medio YP en presencia de glucosa al 2%. A mitad de la fase de crecimiento exponencial se recogieron por centrifugación a 5000 rpm durante 3 minutos y se diluyeron a la mitad en medio fresco conteniendo glucosa al 2%. Este cultivo se incubó a 35°C, durante 2 horas. Transcurrido este tiempo se recogió por centrifugación la cantidad de células necesaria para llevar a cabo el ensayo de captación de LY, en presencia de 4 mg/ml de colorante. El objetivo empleado fue de 40x y el tiempo de exposición de 30 segundos.

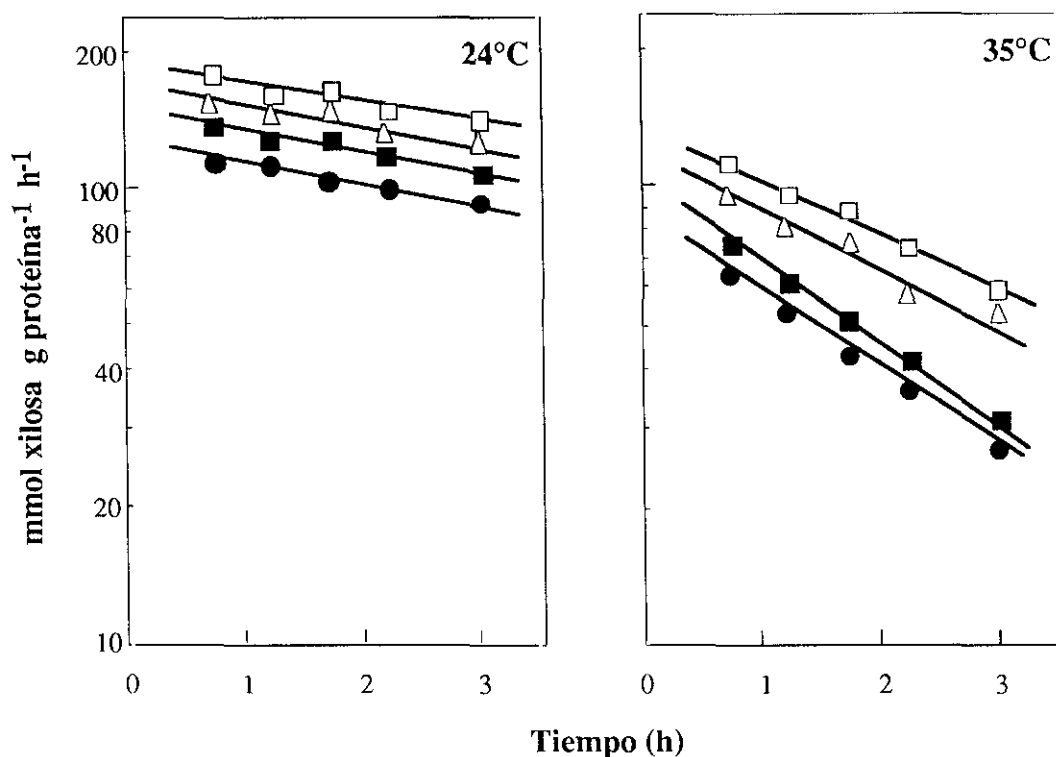


Figura 19. Inactivación del sistema de transporte de glucosa en cepas con endocitosis aumentada, a 24°C y 35°C.

Las células se crecieron a 24°C en YP con glucosa al 2%. A mitad de la fase de crecimiento exponencial se diluyeron a la mitad en medio fresco conteniendo 2% glucosa. Este cultivo se dividió en dos alícuotas y cada una de ellas se incubó 2 horas a 24°C o 35°C. Transcurrido este tiempo se lavaron con agua destilada y se resuspendieron en medio mínimo con glucosa al 2% y los requerimientos necesarios en presencia de 10 $\mu\text{g/ml}$ de cicloheximida. Se incubaron a 24°C (A) y a 35°C (B), y a los tiempos indicados se recogieron alícuotas conteniendo 4 mg de proteína y se valoró el transporte de glucosa (Métodos 2.3.1.1). Cepas: 288U (*TSI*) (□), TY17 (*TSI*) (Δ), 54P (*tsI*) (■), H17 (*tsI*) (●). Los datos corresponden a la media de cinco experimentos.

Tabla 7. Vida media del sistema de transporte de glucosa en cepas con endocitosis aumentada.

Cepas	Genotipo relevante	Vida media (h)	
		24°C	35°C
288U	<i>TS1</i>	6.9	2.7
54P	<i>ts1</i>	6.8	1.7
H17	<i>ts1</i>	6.7	1.9
TY17	<i>ts1::Ylp::TS1</i>	6.8	2.3

Los experimentos se realizaron como se describe en la figura 19.

diferencia, aunque pequeña, resultó ser estadísticamente significativa ($2P < 0.05$). Para comprobar si durante la inactivación se mantenían las diferencias de endocitosis entre las cepas utilizadas medimos de forma cualitativa la endocitosis de estas células tras 4 horas en condiciones de inactivación. Los resultados obtenidos indicaron que el patrón de captación de LY fue similar en todos los casos al obtenido cuando las células no se habían sometido a las condiciones de inactivación (Fig. 18).

De los resultados obtenidos podemos concluir que un aumento en la velocidad de endocitosis va acompañado de un aumento en la velocidad de inactivación catabólica del transporte de glucosa, lo que sugiere que ambos procesos están relacionados.

3.3.2. Relación entre la endocitosis y la inactivación catabólica del transportador de K^+ .

En lo que se refiere al transporte de K^+ observamos que cuando se sometían las células a condiciones de inactivación a 24°C , se producía un descenso en la actividad del transporte de K^+ que ocurría a la misma velocidad tanto en las cepas con el gen *TSI* como en las que portan la mutación *tsI* (Fig. 20). En todos los casos la vida media de este transporte a esta temperatura fue de 6.4 horas (Tabla 8). Sin embargo, cuando las células se sometieron a inactivación a 35°C , se observó que tanto la cepa silvestre como la transformada mantenían la misma velocidad de inactivación que a 24°C mientras que las dos cepas que tienen endocitosis aumentada presentan un aumento de la velocidad de inactivación de unas tres veces (Fig. 20). En este caso la vida media del transportador en las cepas mutantes fue alrededor de 2 horas mientras que en la cepa silvestre y en la cepa transformada fue de más de 6 horas (Tabla 8).

Este aumento en la velocidad de inactivación en las cepas con endocitosis aumentada sugería, como en el caso del transporte de glucosa, que un incremento en la velocidad de endocitosis iba acompañado de un incremento en la velocidad de inactivación catabólica del transportador de K^+ . Sin embargo, en el caso de este transportador existía al menos otra posibilidad para explicar los resultados. Como hemos mencionado más arriba, el transporte de

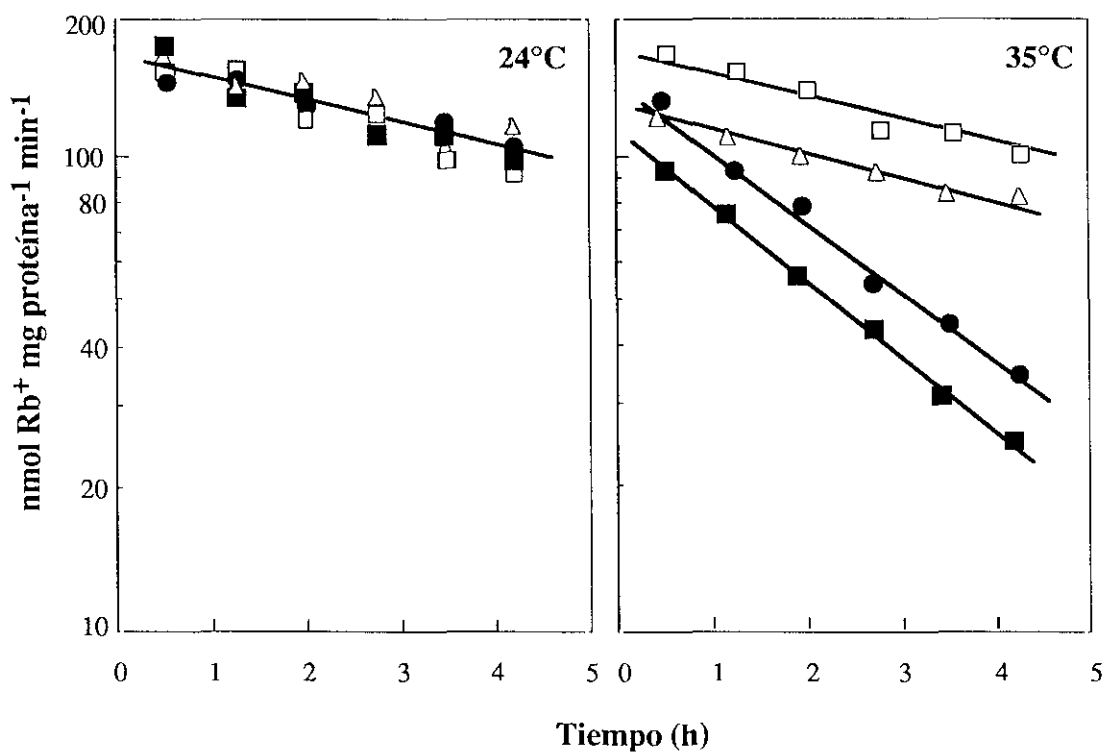


Figura 20. Inactivación del sistema de transporte de K^+ en cepas con endocitosis aumentada a 24°C y 35°C .

Las células se trataron como se indica en la figura 19. A los tiempos indicados se recogieron alícuotas conteniendo 3 mg de proteína y se valoró el transporte de K^+ (Métodos 2.3.2). Cepas: 288U (*TSI*) (□), TY17 (*TSI*) (Δ), 54P (*tsI*) (■), H17 (*tsI*) (●). Los datos corresponden a la media de tres experimentos.

Tabla 8. Vida media del sistema de transporte de K⁺ en cepas con endocitosis aumentada.

Cepas	Genotipo relevante	Vida media (h)	
		24°C	35°C
288U	<i>TS1</i>	6.4	6.4
54P	<i>ts1</i>	6.4	1.9
H17	<i>ts1</i>	6.4	2.1
TY17	<i>ts1::Ylp::TS1</i>	6.4	5.9

Los experimentos se realizaron como se describe en la figura 20.

K^+ depende del potencial de membrana, que a su vez es dependiente de la actividad de la H^+ -ATPasa. Si el aumento de la endocitosis en estas cepas fuese acompañado de una pérdida de actividad de la H^+ -ATPasa, el descenso en el potencial de membrana provocado podría ser el responsable del descenso observado en la actividad del transporte de K^+ . Para investigar si en las cepas mutantes la H^+ -ATPasa se inactiva durante la incubación a $35^\circ C$ en las condiciones experimentales empleadas medimos la actividad de esta enzima. Como puede verse en la tabla 9 tras 4 horas de incubación a $35^\circ C$ en las condiciones inactivantes la actividad H^+ -ATPasa descendió aproximadamente un 20% en las cepas mutantes en comparación con la silvestre, mientras que la actividad del sistema de transporte de K^+ descendió un 70%. Como ya hemos demostrado más arriba (Resultados, 1.3), un descenso de hasta un 60% en la actividad de esta enzima es responsable de tan sólo un 25% de pérdida de actividad del sistema de transporte de K^+ por lo que podemos concluir que el incremento en la inactivación del transporte de K^+ observada no puede atribuirse a la inactivación de la H^+ -ATPasa, sino al incremento de la velocidad de la endocitosis en estas cepas.

3.4. Papel del proteasoma en la inactivación catabólica del transportador de maltosa.

En levadura existen dos sistemas mayoritarios de proteólisis: la vacuola y el proteasoma. Con objeto de averiguar si el proteasoma está implicado en la degradación del transportador de maltosa ocurrida durante la inactivación catabólica empleamos dos cepas con mutaciones simples, *pre1-1* y *pre2-1*, y una cepa con la doble mutación, *pre1-1 pre2-1* (Tabla 1). Estas cepas son defectuosas en la actividad similar a quimotripsina del proteasoma (Heinemeyer *et al*, 1991; Heinemeyer *et al*, 1993) por lo que presentan disminuída la degradación de proteínas y acumulan proteínas unidas a ubiquitina en condiciones de estrés. Como se puede ver en la figura 21, al someter las células de estos mutantes a condiciones de inactivación se observó un descenso en la actividad del transporte de maltosa a una velocidad que fue similar a la observada en la cepa silvestre. A partir de los datos de esta figura 21 se calculó la vida media

Tabla 9. Actividad de la H⁺-ATPasa y del sistema de transporte de K⁺, en cepas con endocitosis aumentada, al cabo de 4 horas de inactivación.

Cepas	ATPasa		Transporte de K ⁺	
	24°C	35°C	24°C	35°C
288U	"100"	"100"	"100"	"100"
54P	97	87	103	32
H17	102	80	100	27
TY17	100	93	100	80

Las células fueron tratadas como se indica en la Fig 19. Después de 4 horas de incubación a las temperaturas indicadas se midió la actividad H⁺-ATPasa y la del transporte de K⁺. La actividad ATPasa se valoró en membranas crudas en presencia de 2 mM ATP (Métodos 2.6.1.). El transporte de K⁺ se valoró en células enteras en presencia de 5 mM RbCl (Métodos 2.3.2.). Los valores son relativos a los de la cepa silvestre. Los valores absolutos encontrados de las actividades de la cepa silvestre a 24°C y 35°C fueron, respectivamente, 0.48 y 0.56 $\mu\text{mol P}_i \text{ mg proteína}^{-1} \text{ min}^{-1}$ para la ATPasa y 90 y 85 $\text{nmol Rb}^+ \text{ mg proteína}^{-1} \text{ min}^{-1}$ para el transporte de K⁺. Los datos corresponden a la media de dos experimentos.

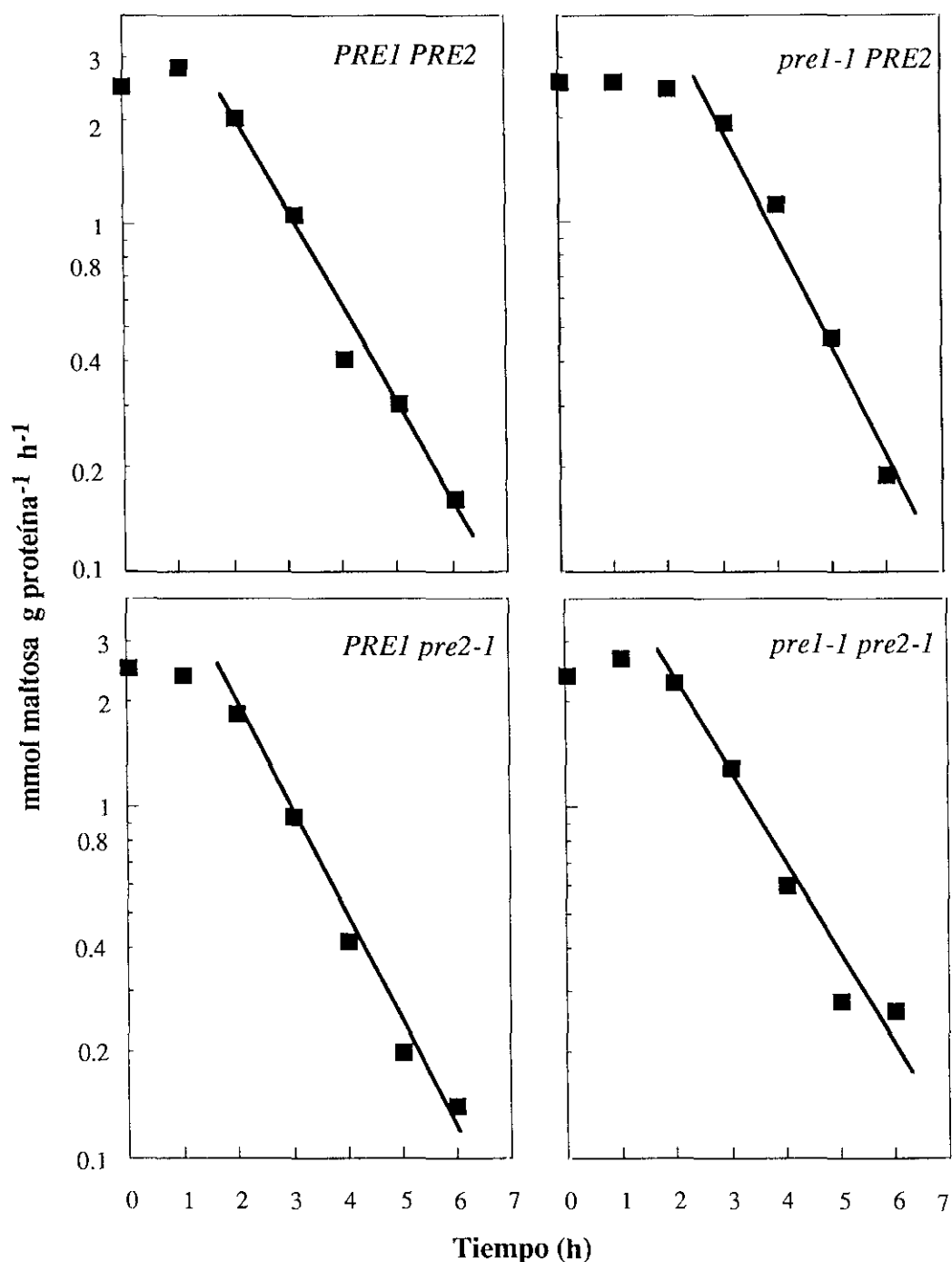


Figura 21. Inactivación del sistema de transporte de maltosa en cepas deficientes en la actividad del proteasoma.

Las células se crecieron a 28°C en YP con maltosa al 2% en presencia de 3 ppm de antimicina A. A mitad de la fase de crecimiento exponencial se transfirieron a un volumen 3 veces superior de medio mínimo sin amonio en presencia de glucosa al 2%, 10 $\mu\text{g/ml}$ de cicloheximida y 250 $\mu\text{g/ml}$ de clorhidrato de tetraciclina. Se incubaron a 28°C y a los tiempos indicados se recogieron alícuotas y se valoró el transporte de maltosa (Métodos 2.3.1.2). Los datos corresponden a la media de dos experimentos.

del transportador que, en todas las cepas, fue aproximadamente de 1 hora. Resultados semejantes se obtuvieron cuando, en vez de medir actividad, se midió el contenido celular de este transportador. En este caso utilizamos solamente la cepa silvestre y el doble mutante *pre1-1 pre2-1* y los resultados obtenidos mostraron que el contenido celular del transportador también disminuye a la misma velocidad en la cepa silvestre que en el doble mutante (Fig. 22). Todos estos resultados indican que la actividad proteolítica del proteasoma no está implicada en la inactivación catabólica del transporte de maltosa.

3.5. Papel de la vacuola en la inactivación catabólica del transportador de maltosa.

Para investigar si el otro sistema mayoritario de degradación de proteínas, la vacuola, está implicado en la proteólisis del transportador de maltosa investigamos tanto la actividad como el contenido de este transportador en cepas deficientes en proteasas vacuolares. Utilizamos dos cepas mutantes, una cepa que presenta una mutación en el gen *PRA1* que codifica la proteinasa *yscA*, y otra cepa que presenta sendas mutaciones en los genes *PRA1* y *PRB1* y que, como consecuencia, es defectiva en las proteinasas *yscA* e *yscB* (Tabla 1). La capacidad proteolítica de la vacuola en estas cepas está reducida en un 70 y un 85% respectivamente en comparación con una cepa silvestre (Teichert *et al*, 1989). Cuando sometimos estas células a condiciones de inactivación observamos que la actividad del transporte disminuía a la misma velocidad tanto en las células mutantes como en las células silvestres (Fig. 23) lo que indica que el transportador desaparece de la membrana plasmática, en otras palabras, es internalizado a la misma velocidad en todas las cepas estudiadas. La vida media calculada fue de 1 hora aproximadamente. Ahora bien, cuando en vez de medir actividad medimos el contenido celular del transportador observamos que éste contenido disminuía a una velocidad aproximadamente 5 veces más lenta en las cepas mutantes que en la cepa silvestre (Fig. 24). Los valores de vida media obtenidos calculados a partir de estos resultados se muestran en la tabla 10. Estos resultados indican que, una vez internalizado, la degradación del transportador ocurre mucho más despacio en las cepas

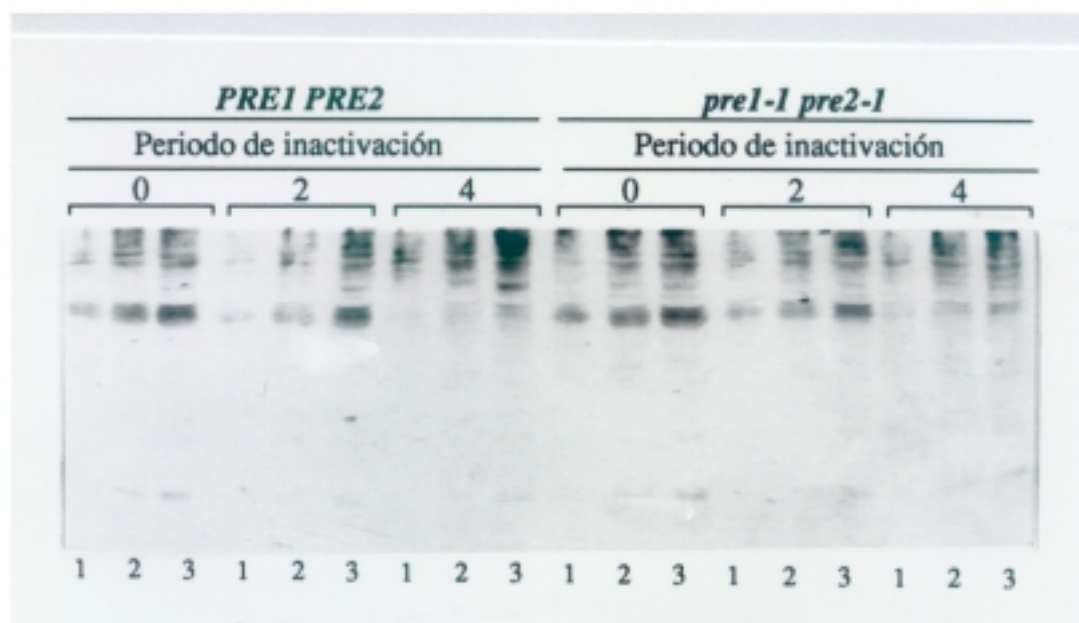


Figura 22. Contenido en transportador de maltosa en el doble mutante deficiente en la actividad del proteasoma durante la inactivación catabólica.

Las células se trataron como se indica en la figura 21. Una vez resuspendidas en el medio de inactivación (células no inactivadas) y tras 2 y 4 horas de incubación a 28°C (células inactivadas) se recogieron alícuotas, de las que se obtuvo el extracto crudo. La inmunodetección del transportador de maltosa se desarrolló como se indica en la figura 17. De cada muestra se cargaron en el gel 10, 17 y 25 µg de proteína.

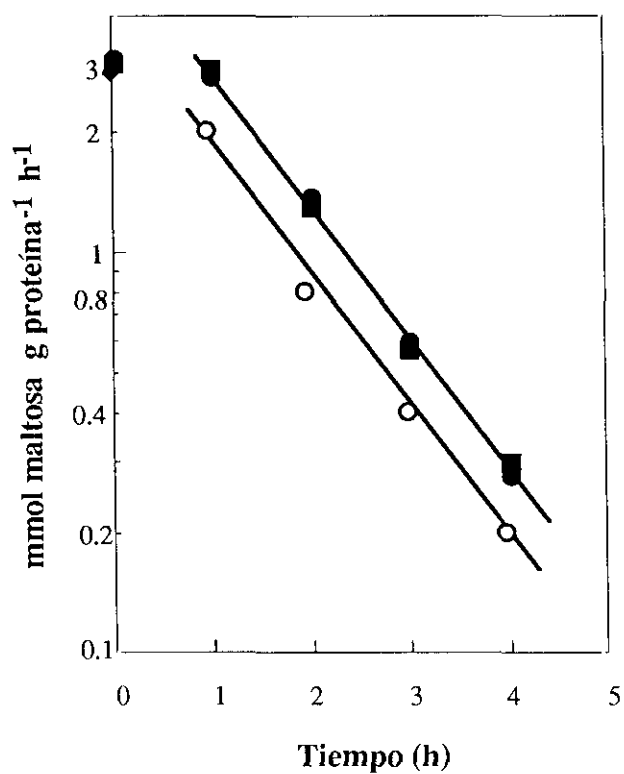


Figura 23. Inactivación del sistema de transporte de maltosa en cepas deficientes en proteasas vacuolares.

El experimento se realizó como se indica en la figura 21. Cepas: (■) *PRA1 PRB1*, (○) *pral-1* y (●) *pral-1/prb1-1*. Los datos corresponden a la media de dos experimentos.

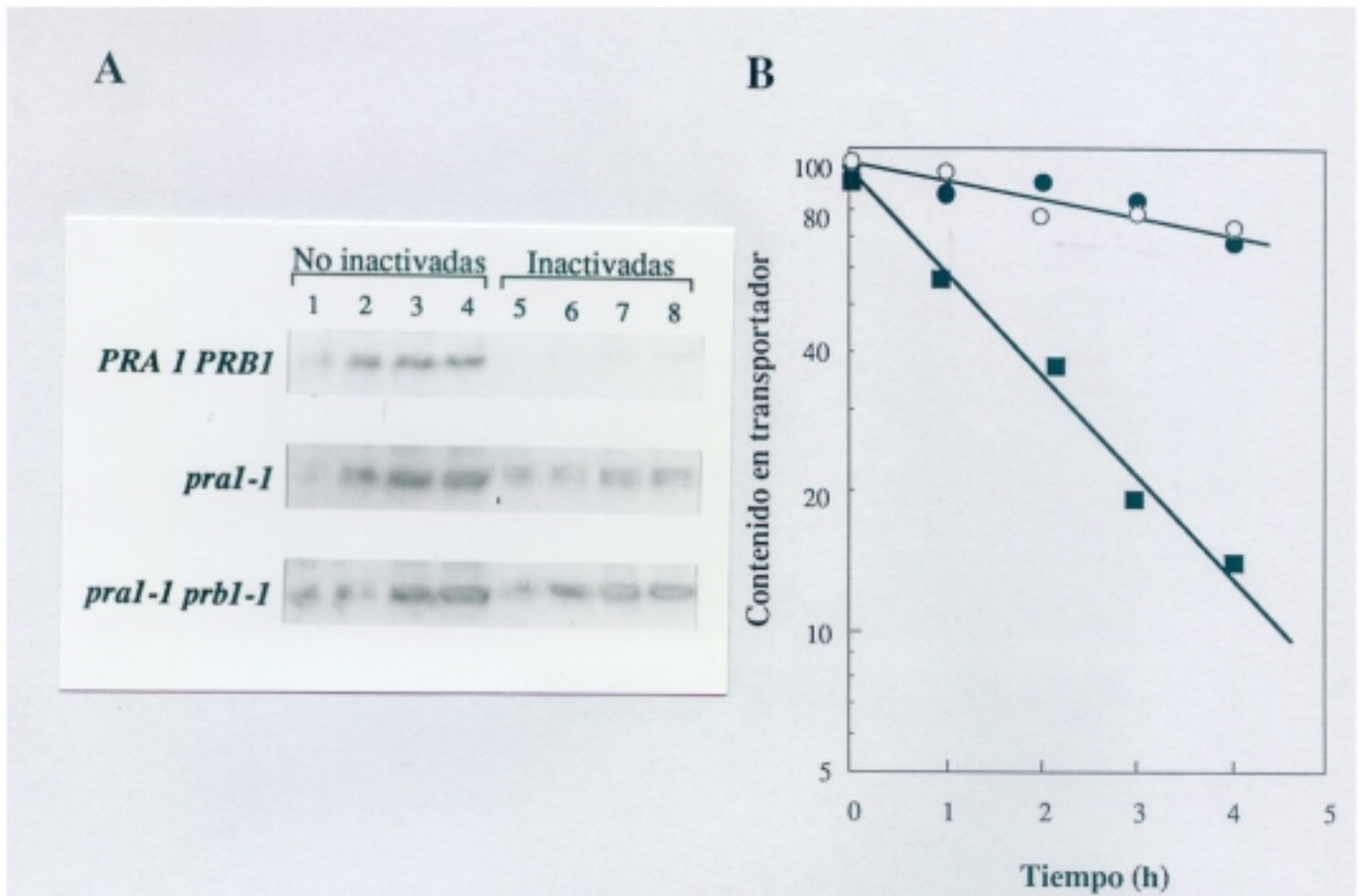


Figura 24. Contenido en transportador de maltosa en mutantes deficientes en proteasas vacuolares.

(A). Las células se trataron como se indica en la figura 21. Una vez resuspendidas en el medio de inactivación (células no inactivadas) y tras 4 horas de incubación a 28°C (células inactivadas) se recogieron alícuotas, de las que se obtuvo el extracto crudo. La inmunodetección del transportador de maltosa se desarrolló como se indica en la figura 17. Los carriles 1 al 4 y 5 al 8 contienen 15, 25, 40 y 50 µg de proteína.

(B). Representación en unidades arbitrarias de la densitometría de las bandas correspondientes al transportador de maltosa. Cepas: (■) *PRA1 PRB1*, (○) *pral-1* y (●) *pral-1/prb1-1*. Los datos corresponden a la media de dos experimentos.

Tabla 10. Vida media del transporte de maltosa en cepas deficientes en proteasas vacuolares.

Cepas	Genotipo relevante	Vida media (h)	
		Actividad	Contenido
WCG4a	<i>PRA1PRB1</i>	1.0	1.4
YMTA	<i>pral-1</i>	1.0	7.0
YMTAB	<i>pral-1 prb1-1</i>	1.0	7.0

Los experimentos se realizaron como se indica en las figuras 23 y 24.

con la función vacuolar alterada que en la silvestre lo que sugiere fuertemente que la vacuola se halla implicada en la degradación.

Si realmente la vacuola se hallase implicada en la degradación del transportador los mutantes afectados en su función deberían acumular el transportador en este compartimento celular. Para probar esta hipótesis realizamos experimentos de inmunofluorescencia en los que utilizamos la cepa silvestre y el doble mutante *pral-1/prb1-1* y los anticuerpos anti-transportador previamente purificados por afinidad como se describe en Métodos 2.8.4. Los resultados obtenidos mostraron que células creciendo exponencialmente en presencia de maltosa presentaban una fluorescencia difusa que cubría toda la superficie celular. Estos resultados son consistentes con el hecho de que el transportador se halla localizado en la membrana plasmática (Fig. 25). Ahora bien, cuando las células fueron sometidas a condiciones de inactivación durante 4 horas, la cepa con la doble mutación presentó un acúmulo de fluorescencia en un compartimento celular distinto del núcleo identificado con DAPI, un colorante fluorescente que se une al DNA (Fig. 25). El aspecto y el tamaño del compartimento celular donde se detecta el transportador de maltosa unido al anticuerpo sugiere que se trata de la vacuola y por lo tanto los resultados confirman los ya obtenidos e indican fuertemente que la vacuola está implicada en la inactivación catabólica del transportador de maltosa.

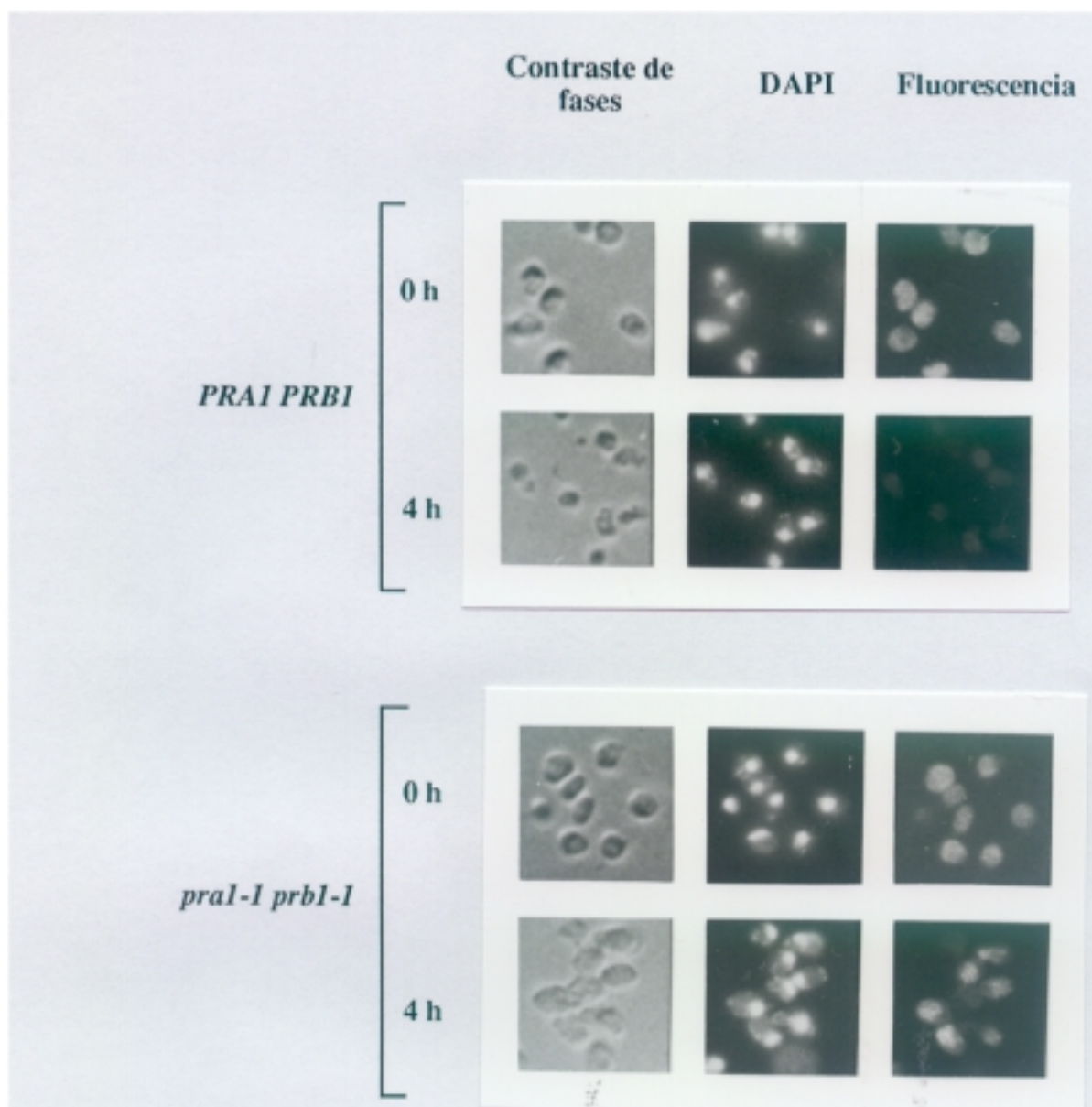


Figura 25. Detección por inmunofluorescencia del transportador de maltosa.

Las células se crecieron a 28°C en YP con maltosa al 2% en presencia de 3 ppm de antimicina A. A mitad de la fase de crecimiento exponencial se diluyeron en un volumen dos veces superior de medio mínimo en ausencia de fuente de nitrógeno con glucosa al 2%. Inmediatamente y tras 4 horas de incubación a 28°C se recogieron alícuotas en las que se detectó el transportador de maltosa por inmunofluorescencia (Métodos 2.8.5).

DISCUSSION

DISCUSION

La mayoría de las proteínas de *Saccharomyces cerevisiae* son muy estables en diferentes condiciones metabólicas y su vida media supera incluso las 70 horas (Gancedo *et al*, 1982). Sin embargo, existe un pequeño grupo de proteínas, alrededor del 10%, que presenta una vida media corta. Los transportadores de azúcares parecen pertenecer a este grupo ya que se inactivan rápidamente durante la fermentación en ausencia de síntesis de proteínas debida bien a la carencia de una fuente de nitrógeno, bien a la presencia de un inhibidor como la cicloheximida. En estas condiciones la vida media de estas proteínas oscila entre 1 y 5 horas (Lagunas *et al*, 1982; Busturia y Lagunas, 1985; Busturia y Lagunas, 1986; DeJuan y Lagunas, 1986). En un principio se pensó que esta inestabilidad podría ser una característica particular de los transportadores de azúcares. Sin embargo, se ha visto que una inestabilidad semejante afecta también a otras proteínas de membrana plasmática. Hemos mostrado en este trabajo que el transportador de K^+ presenta una vida media de tan sólo 3.5 horas durante la fermentación tras la inhibición de la síntesis de proteínas y también en un trabajo previo de nuestro laboratorio (Benito *et al*, 1991) se mostró que en condiciones similares a las descritas la vida media de la H^+ -ATPasa es de unas 11 horas, valor que está muy por debajo del valor de vida media de la mayoría de las proteínas de este organismo. También en otros laboratorios, utilizando condiciones experimentales que incluyen el ayuno de algún nutriente o algún otro tipo de estrés, se ha podido comprobar que otras proteínas de membrana plasmática son inestables. De hecho, la vida media de la permeasa de uracilo es de alrededor de 1 hora durante el ayuno de nutrientes como compuestos nitrogenados, fosfato o fuentes de carbono (Volland *et al*, 1993). También una vida media corta se ha observado para la permeasa general de aminoácidos o Gap1p, si bien en este caso el factor desencadenante de la inactivación no es la carencia de un nutriente sino la presencia de iones amonio en el medio (Grenson, 1983). En realidad puede decirse que la actividad de todas las proteínas de membrana plasmática de levadura estudiadas hasta la fecha es mucho menos estable que la actividad de la mayoría de las proteínas de este organismo en condiciones análogas y es importante señalar que en los casos en que la disponibilidad de

anticuerpos ha permitido estudiar el mecanismo de esta pérdida de actividad se ha podido demostrar que es debida a proteólisis (Benito *et al*, 1991; Lucero *et al*; 1993; Volland *et al*; 1993; Hein y Andre, 1994).

El hecho de que, en general, las proteínas de membrana plasmática sean tan inestables hace sospechar que en la mayoría de los casos la estabilidad no se deba a mecanismos de regulación desencadenados específicamente por condiciones fisiológicas particulares, sino que más bien se deba a la estimulación del recambio general de proteínas producido cuando las células se someten a condiciones adversas. De hecho, se sabe que el principal mecanismo de respuesta a condiciones de estrés, como son la ausencia de los nutrientes aquí mencionados o la acción de factores fisico-químicos extremos, consiste en la degradación de un elevado número de proteínas bien porque sean innecesarias, bien porque estén alteradas (Hilt y Wolf, 1992).

En eucariotas superiores la degradación de las proteínas de membrana plasmática se lleva a cabo por proteinasas lisosomales, citosólicas y extracelulares. Para una proteína dada puede darse el caso de que en su degradación participen más de un sistema de proteinasas. Por ejemplo, el dominio extracelular de la proteína puede ser eliminado en el medio externo por la acción de proteinasas extracelulares mientras que el dominio citoplasmático puede ser degradado por proteinasas citoplásmicas y el dominio transmembrana por proteinasas lisosomales. Por otra parte la degradación de las proteínas de membrana plasmática puede llevarse a cabo completamente en la propia membrana plasmática o en algún lugar diferente de la célula donde han sido sintetizadas (Hare, 1990). Sin embargo, en organismos eucariotas se sabe que el principal mecanismo de degradación de proteínas de membrana plasmática se lleva a cabo tras su internalización por endocitosis y su posterior liberación al lisosoma que es donde tiene lugar la proteólisis no selectiva de las mismas. En el caso de *Saccharomyces cerevisiae* se ignora casi todo sobre la degradación de estas proteínas aunque se sospecha que ocurrirá probablemente por mecanismos semejantes a los descritos en otros organismos eucariotas. De hecho, se ha demostrado que existe una relación entre la internalización de proteínas de membrana por endocitosis y su degradación. Ejemplos de esta relación son los receptores de los

factores α y α , que se pueden internalizar unidos a sus respectivos ligandos o en ausencia de éstos (Singer y Riezman, 1990; Davis *et al*, 1993), para ser posteriormente degradados en el interior de la célula. También ejemplos de este mecanismo son la degradación de la permeasa de uracilo (Volland *et al*, 1993) y la de los transportadores de maltosa, glucosa y K^+ (este trabajo), en los que la degradación requiere la internalización previa de estas proteínas por endocitosis.

En eucariotas superiores, los receptores y proteínas internalizadas por endocitosis pueden ser detectadas en el sistema de endosomas. Una parte de estas proteínas son liberadas en el lisosoma pero la mayoría de ellas, así como también aproximadamente el 50% de los compuestos que entran en la célula por endocitosis de fase fluida, no son liberados en el lisosoma sino que son devueltos a la superficie celular desde los endosomas (Gruenberg y Howell, 1989). Este reciclaje se lleva a cabo a través de un compartimento que presenta un morfología tubular y se halla próximo a la superficie celular. De esta forma no sólo las proteínas vuelven a la membrana plasmática, sino que también los componentes lipídicos de ésta que han sido internalizados son devueltos a ella en un proceso no específico (Mayor *et al*, 1993). No se sabe si un mecanismo de reciclaje similar al descrito podría tener lugar en levadura pero algunos hechos lo sugieren. Se ha visto que el mutante *ren1*, que está afectado en la transición de endosomas a vacuola, presenta acumulación de receptor del factor α en la membrana plasmática (Davis *et al*, 1993) lo que podría indicar que al estar impedido el paso de proteínas endocitadas a la vacuola éstas retornan a la membrana plasmática. Sin embargo, no se puede descartar que el fenotipo de estos mutantes sea debido a otras causas. Por ejemplo a que el producto del gen *REN1* intervenga en la internalización de estas proteínas. En este sentido se están llevando a cabo experimentos en nuestro laboratorio con un mutante *sec18*. Como se ha mencionado anteriormente, el producto del gen *SEC18* está implicado en la fusión de endosomas. Los mutantes *sec18* internalizan el factor α pero no lo liberan a vacuola sino que lo acumulan en endosomas. Resultados preliminares obtenidos midiendo tanto actividad como contenido del transportador de maltosa en un mutante *sec18* y en dos cepas isogénicas controles apoyan la hipótesis del reciclaje. Sin embargo, la demostración directa de esta hipótesis requiere la

identificación en la membrana plasmática del transportador previamente internalizado. Esta demostración no será posible en tanto no se disponga de un método fiable para identificar en la membrana proteínas que hayan sido internalizadas.

En eucariotas superiores se sabe que las proteínas de membrana plasmática que son internalizadas pero que no son recicladas a la superficie celular continúan a través de la vía de la endocitosis hasta la vacuola donde son degradadas. Sin embargo, existe la posibilidad de que además de la vacuola, también proteinasas citoplasmáticas como el proteasoma intervengan en esta degradación. Cuando las proteínas están ancladas en la membrana sólo el dominio citoplasmático puede ser accesible a la proteólisis en este compartimento celular, pero cuando las proteínas han sido endocitadas podrían ser liberadas de los endosomas quedando expuestas a la acción del proteasoma. Se sabe que este complejo multienzimático interviene al mismo tiempo que la vacuola en la degradación de proteínas durante situaciones de estrés. Por ejemplo se ha visto que la esporulación, que es inducida por ayuno de ciertos nutrientes y que incluye proteólisis de un cierto número de proteínas, depende tanto de la presencia de proteinasas vacuolares (Teichert *et al*, 1989) como de la presencia del proteasoma funcional (Heinemeyer *et al*, 1991). La participación de la vacuola y el proteasoma en la degradación de proteínas concretas ha sido estudiada en el caso de la fructosa-1,6-bisfosfatasa. Como ya hemos indicado anteriormente, la presencia de glucosa provoca la inactivación de esta proteína y su degradación. Según unos autores esta degradación ocurre en la vacuola (Chiang y Schekman, 1994) mientras que otros autores concluyen que la presencia del azúcar induce la degradación en el proteasoma (Schork *et al*, 1994). Los resultados presentados en este trabajo sobre el transportador de maltosa indican claramente que en las condiciones inactivantes empleadas, es decir, ausencia de fuente de nitrógeno y presencia de un azúcar fermentable, el proteasoma no interviene en la degradación de esta proteína de membrana. Que nosotros sepamos la eventual participación del proteasoma en la degradación de una proteína de membrana plasmática no ha sido investigada anteriormente.

Se sabe que la vía de la ubiquitina está implicada en la degradación de las proteínas en el

proteasoma. A pesar de que nuestros resultados indican que el proteasoma no está implicado en la degradación del transportador de maltosa no se puede descartar la participación de la ubiquitina en la degradación de esta proteína. Hasta hace poco se pensaba que las proteínas citosólicas de vida media corta ligaban ubiquitina y eran degradadas en el proteasoma, mientras que las proteínas de membrana plasmática se degradaban en la vacuola, tras su internalización por endocitosis, de forma independiente de ubiquitina. Sin embargo, dos hechos indican que esta idea podría no ser del todo cierta. Por un lado, se han encontrado proteínas unidas a ubiquitina, tanto en lisosomas de eucariotas superiores (Laszlo *et al*, 1990) como en vacuola de levadura (Simeon *et al*, 1992). Por otro lado, también se ha visto que ciertas proteínas de membrana, que se sabe se degradan en vacuola, aparecen asociadas a ubiquitina, tanto en eucariotas superiores (Cahoreau *et al*, 1992; Mori *et al*, 1992) como en levadura (Kölling y Hollenberg, 1994). En *S. cerevisiae*, hasta ahora se han identificado sólo dos proteínas que unen ubiquitina, el represor MAT α 2 (Hochstraser *et al*, 1991) y el transportador Ste6 (Kölling y Hollenberg, 1994). El transportador Ste6 pertenece a la familia de transportadores ABC y comparte una gran homología de secuencia con algunos transportadores de mamíferos. Es necesario para la secreción del factor a, y se ha observado que se acumula en la membrana plasmática en los mutantes en endocitosis *end3* y *end4*. Cuando se localiza en membrana esta proteína es ubiquitinizada y su vida media es más larga en el doble mutante *ubc4 ubc5*. Ubc4p y Ubc5p están implicadas en la degradación por la vía de la ubiquitina de proteínas anormales y de vida media corta y su presencia es necesaria para la viabilidad de la célula en condiciones de estrés (Ciechanover, 1994).

Otro indicio a favor de la implicación de la ubiquitina en la degradación de proteínas de membrana plasmática se ha obtenido con el estudio de la permeasa de uracilo. En esta proteína se ha encontrado una secuencia de 9 aminoácidos muy similar a una secuencia que aparece en las ciclinas, necesaria para la degradación de éstas por la vía de la ubiquitina (Glutzer *et al*, 1991; Volland *et al*, 1994). Se ha observado, además, que mutaciones en un residuo de arginina conservado en estas secuencias, retrasa la degradación de la permeasa. Esta secuencia

no actúa como sitio de unión de ubiquitina, sino que más bien actuaría en el reconocimiento por una enzima implicada en la unión de ubiquitina o de forma indirecta afectando a un sitio de reconocimiento (Ciechanover, 1994). Por otra parte, se ha demostrado que la degradación de esta proteína, que ocurre en vacuola, requiere la presencia de otra proteína denominada Npi1p. El extremo carboxilo de esta proteína es homólogo, con un 30% de identidad, al de una ligasa de la vía de la ubiquitina en humanos, la E6-AP (Scheffner *et al*, 1993). La proteína Npi1p está también implicada en la inactivación y degradación de otra proteína de membrana plasmática, la permeasa general de aminoácidos, Gap1p (Springael y Andre, 1994).

Resulta evidente de los hechos mencionados que el conocimiento sobre la proteólisis de las proteínas de membrana plasmática de levadura dista mucho de ser completo. Sin embargo, parece muy probable que la disponibilidad de mutantes en las vías proteolíticas propicie en los próximos años el avance rápido en este campo.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

Los resultados presentados en este trabajo sugieren las siguientes conclusiones:

1. El transportador de K^+ en levadura sufre una inactivación tras la inhibición de la síntesis de proteínas. Esta inactivación se debe a cambios en la V_{max} , presenta cinética de primer orden, es dependiente de energía y es estimulada por la presencia de un sustrato fermentable. Estas características sugieren que la inactivación es debida a una proteólisis del transportador.

2. El hecho de que otras proteínas de membrana plasmática como los transportadores de azúcares y la H^+ -ATPasa, presenten una inactivación semejante a la descrita para el transportador de K^+ sugiere que esta inactivación no es debida a un proceso específico de regulación sino a un aumento del recambio general de proteínas que tiene lugar en las condiciones en que se produce la inactivación.

3. En contra de lo descrito por otros autores, la inactivación de estas proteínas de membrana ocurre independientemente de la actividad de la proteína kinasa dependiente de cAMP así como también de la subunidad reguladora de esta enzima.

4. La inactivación de los transportadores de K^+ , glucosa y maltosa tiene lugar en el interior de la célula tras un proceso de endocitosis. Probablemente la inactivación de los otros transportadores mencionados ocurrirá por un mecanismo similar.

5. La proteólisis del transportador de maltosa ocurrida durante su inactivación catabólica tiene lugar en la vacuola y es independiente de la actividad del proteasoma.

BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFIA

- Alijo, R. y Ramos, J.** (1993). Several routes of activation of the potassium uptake system of yeast. *Biochim. Biophys. Acta* 1179, 224-228.
- Amigo, L., Moreno, E. y Lagunas, R.** (1993). *In vivo* inactivation of the yeast plasma membrane ATPase in the absence of exogenous catabolism. *Biochim. Biophys. Acta* 1151, 83-88.
- Anderson, J.A., Best, L.A. y Gaber, R.F.** (1991). Structural and functional conservation between the high-affinity K⁺ transporters of *Saccharomyces uvarum* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene* 99, 39-46.
- Becker, D.M. y Guarente, L.** (1991). High-efficiency transformation of yeast by electroporation. *Methods Enzymol.* 194, 182-187.
- Behrens, M.M. y Mazón, M.J.** (1988) Yeast cAMP-dependent protein kinase can be associated to the plasma membrane. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 151 (1) 561-567.
- Benito, B., Moreno, E. y Lagunas, R.** (1991). Half-life of the plasma membrane ATPase and its activating system in resting yeast cells. *Biochim. Biophys. Acta* 1063, 265-268.
- Birnboim, H.C.** (1983). A rapid alkaline extraction method for the isolation of plasmid DNA. *Methods Enzymol.* 68, 245-267.
- Bisson, L.F. y Fraenkel, D.G.** (1983). Involvement of kinases in glucose and fructose uptake by *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 80, 1730-1734.
- Bisson, L.F. y Fraenkel, D.G.** (1984). Expression of kinase dependent glucose uptake in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* 159, 1013-1017.
- Bisson, L.F., Coons, D.M., Kruckeberg, A.L. y Lewis, D.A.** (1993). Yeast sugar transporters. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 28 (4) 259-308.
- Borst-Pauwels, G.W.F.H.** (1981). Ion transport in yeast. *Biochim. Biophys. Acta* 650, 88-127.
- Bradford, M.** (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72,

248-252.

- Busturia, A. y 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.
- Busturia, A. y Lagunas, R.** (1986). Catabolite inactivation of the glucose transport systems in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Gen. Microbiol.* 132, 379-385.
- Cahoreau, C., Garnier, L., Dijane, J., Devanchelle, G. y Cerutti, M.** (1994). Evidence for N-glycosylation and ubiquitination of the prolactin receptor expressed in a baculovirus-insect cell system. *FEBS Lett.* 350, 230-234.
- Cameron, S., Levin, L., Zoller, M. y Wigler, M.** (1988). cAMP-independent control of sporulation, glycogen metabolism and heat-shock resistance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell* 53, 555-566.
- Ciechanover, A.** (1994). The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway. *Cell* 79, 13-21.
- Charron, M.J.R., Dubin, A. y Michels, C.A.** (1986). Structural and functional analysis of the *MAL1* locus of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 6, 3891-3899.
- Cherry, J.R., Johnson, T.R., Dollard, C., Shuster, J.R. y Devis, C.L.** (1989). Cyclic AMP-dependent protein kinase phosphorylates and inactivates the yeast transcriptional activator ADR1. *Cell* 56, 409-419.
- Chiang, H.-L. y Sheckman, R.** (1994). Site of catabolite inactivation. *Nature* 369, 283-284.
- Chvatchko, Y., Howald, I. y Riezman, H.** (1986). Two yeast mutants defective in endocytosis are defective in pheromone response. *Cell* 46, 355-364.
- Davis, N.G., Horecka, J.L. y Sprague, G.F., Jr.** (1993). Cis- and trans-acting functions required for endocytosis of the yeast pheromone receptors. *J. Cell Biol.* 122, 53-65.
- DeJuan, C. y Lagunas, R.** (1986). Inactivation of the galactose transport system in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* 207, 258-261.
- Díaz, R., Mayorga, L.S., Weidman, P.J., Rothman, J.E. y Stahl, P.D.** (1989).

- Vesicle fusion following receptor mediated endocytosis requires a protein active in Golgi transport. *Nature* 339, 398-400.
- Dulic, V., Egerton, M., Elguindi, I., Raths, S., Singer, B. y Riezman, H.** (1991). Yeast endocytosis assays. *Methods Enzymol.* 194, 697-710.
- Egner, R., Thumm, M., Straub, M., Simeon, A., Schüller, H-J. y Wolf, D.H.** (1993). Tracing intracellular proteolytic pathways. Proteolysis of fatty acid synthase and other cytoplasmic proteins in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 268 (36) 27269-27276.
- Eraso, P., Mazón, M.J. y Gancedo, J.M.** (1987). Internal acidification and cAMP increase are not correlated in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur. J. Biochem.* 165, 671-674.
- Fischer, M., Hilt, W., Richter-Ruoff, B., Gonen, H., Ciechanover, A. y Wolf, D.H.** (1994). The 26S proteasome of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* 355, 69-75.
- François, J., Van Schaffinger, E. y Hers, H.G.** (1984). The mechanism by which glucose increases fructose-2,6-bisphosphate concentration in *Saccharomyces cerevisiae*: a cyclic-cAMP-dependent activation of phosphofructo-kinase 2. *Eur. J. Biochem.* 145: 187-193.
- Fuhrmann, G.F.** (1992). Regulation of glucose transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biotechnol.* 27, 1-15.
- Gaber, R.F., Styles, C.A. y Fink, G.R.** (1988). *TRK1* encodes a plasma membrane protein required for high-affinity potassium transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 8 (7) 2848-2859.
- Gancedo, C. y Serrano, R.** (1989). Energy yielding metabolism in yeast. En: *The Yeast*, Vol. 3, 2^a ed. (Harrison, J.S. y Rose, A.H., Eds.) 205-259. Academic Press, New York.
- Gancedo, J.M.** (1992). Carbon catabolite repression in yeast. *Eur. J. Biochem.* 206, 297-313.
- Gancedo, J.M., López, S. y Ballesteros, F.** (1982). Calculation of half-lives of proteins in vivo. Heterogeneity in the rate of degradation of yeast proteins. *Mol. Cell Biochem.* 43, 89-95.

- Glotzer, H., Murray, A.W. y Kirschner, M.W.** (1991). Cyclin is degraded by the ubiquitin pathway. *Nature* 349, 132-138.
- Grenson, M.** (1983). Inactivation-reativation process and repression of permease formation regulate several ammonia-sensitive permeases in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur. J. Biochem.* 133, 135-139.
- Gruenberg, J. y Howell, K.E.** (1989). Membrane traffic in endocytosis: insights from cell-free assays. *Ann. Rev. Cell Biol.* 5, 453-481.
- Hanahan, D.** (1986). Techniques for transformation of *E. coli*. En: DNA Cloning. Volumen I (Glover, D.M., ed.) IRL Press, Oxford, 109-135.
- Hare, J.F.** (1990). Mechanisms of membrane protein turnover. *Biochim. Biophys. Acta* 1031, 71-90.
- Hein, C. y Andre, 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. En: Proc. 12th Samll Meeting on Yeast Transport and Energetics, Karpacz, Poland.
- Heinemeyer, W., Gruhler, A., Möhrle, V., Mahé, Y. y Wolf, D.H.** (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 (7) 5115-5120.
- Heinemeyer, W., Kleinschmidt, J.A., Saidowsky, J., Escher, C. y 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 (3) 555-562.
- Hersko, A. y Ciechanover, A.** (1992). The ubiquitin system for protein degradation. *Annu. Rev. Biochem.* 61, 761-807.
- Hilt, W. y Wolf, D.H.** (1992). Stress-induced proteolysis in yeast. *Mol. Microbiol.* 6 (17) 2437-2442.
- Hirsch, H.H., Schiffer, H.H. y Wolf, D.H.** (1992b). Biogenesis of the yeast vacuole (lysosome). Proteinase yscB contributes molecularly and kinetically to vacuolar hydrolase-

- precursor maturation. *Eur. J. Biochem.* 207, 867-876.
- Hirsch, H.H., Schiffer, H.H., Müller, H. y Wolf, D.H.** (1992a). Biogenesis of the yeast vacuole (lysosome). Mutation in the active site of the vacuolar serine proteinase *yscB* abolishes proteolytic maturation of its 73-KDa precursor to the 41.5-KDa peptide. *Eur. J. Biochem.* 203, 641-653.
- Hochstrasser, M., Ellison, M.J., Chan, V. y Varshavsky, A.** (1991). The short-lived MAT α 2 transcriptional regulator is ubiquitinated *in vivo*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 4606-4610.
- Holmes, D.S. y Quigley, M.** (1981). A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. *Anal. Biochem.* 114, 193-198.
- Holzer, H.** (1976). Catabolite inactivation in yeast. *Trends Biochem. Sci.* 1, 178-181.
- Holzer, H.** (1989). Proteolytic catabolite inactivation in *Saccharomyces cerevisiae*. En: Current trends in the study of intracellular protein degradation II. (Knecht, A. y Grisolia, S., eds) *Cell. Biol. Rev.* 21, 305-319.
- Ito, H., Fukuda, K. y Kimura, A.** (1983). Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations. *J. Bacteriol.* 153, 163-168.
- Johnston, M.** (1987). A model fungal gene regulatory mechanism: the *GAL* genes of *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Rev.* 51, 458-476.
- Jones, E.W.** (1991). Three proteolytic systems in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 266 (13) 7963-7966.
- Knop, M., Schiffer, H.H., Rupp, S. y Wolf, D.H.** (1993) Vacuolar/lysosomal proteolysis: proteases, substrates, mechanisms. *Curr. Op. Cell Biol.* 5, 990-996.
- Ko, C.H., Buckley, A.M. y Gaber, R.F.** (1990). *TRK2* is required for low affinity K⁺ transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 125, 305-312.
- Kölling, R. y Hollenberg, C.P.** (1994). The ABC-transporter Ste6 accumulates in the plasma membrane in a ubiquitinated form in endocytosis mutants. *EMBO J.* 13 (14) 3261-3271.
- Krebs, E.G. y Beavo, J.A.** (1979). Phosphorylation-dephosphorylation of enzymes.

- Ann. Rev. Biochem. 48, 923-959.
- Kruckeberg, A.L. y Bisson, L.F.** (1990). The *HXT2* gene of *Saccharomyces cerevisiae* is required for high-affinity glucose transport. *Mol. Cell. Biol.* 10 (11) 5903-5913.
- Kübler, E. y Riezman, H.** (1993). Actin and fimbrin are required for the internalization step of endocytosis in yeast. *EMBO J.* 12 (7) 2855-2862.
- Laemmli, U.K.** (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Lagunas, R.** (1993). Sugar transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol. Rev.* 104, 229-242.
- Lagunas, R., Domínguez, C., Busturia, A. y Sáez, M.J.** (1982). Mechanisms of appearance of the Pasteur Effect in *Saccharomyces cerevisiae*. Inactivation of the sugar transport systems. *J. Bacteriol.* 152, 19-25.
- Laszlo, L., Doherty, F.J., Osborn, N.U. y Mayer, R.J.** (1990). Ubiquitinated protein conjugates are specifically enriched in the lysosomal system of fibroblasts. *FEBS Lett.* 261 (2) 365-368.
- Lillie, S.H. y Brown, S.S.** (1987). Artifactual immunofluorescent labelling in yeast, demonstrated by affinity purification of antibody. *Yeast* 3, 63-70.
- López-Boado, Y.S., Herrerro, P., Fernández, T. y Moreno, F.** (1988). Glucose-stimulated phosphorylation of yeast isocitrate lyase *in vivo*. *J. Gen. Microbiol.* 134, 2499-2505.
- Loureiro-Días, M.C. y Peinado, J.M.** (1984). Transport of maltose in *Saccharomyces cerevisiae*. Effect of pH and potassium ions. *Biochem. J.* 222, 293-298.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. y Randall, R.J.** (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265-275.
- Lucero, P., Herweijer, M. y Lagunas, R.** (1993). Catabolite inactivation of the yeast maltose transporter is due to proteolysis. *FEBS Lett.* 333 (1,2) 165-168.
- Makarow, M.** (1985a). Endocytosis in *Saccharomyces cerevisiae*: internalization of α -amylase and fluorescent dextran into cells. *EMBO J.* 4 (7) 1861-1866.

- Makarow, M.** (1985b). Endocytosis in *Saccharomyces cerevisiae*: internalization of enveloped viruses into spheroplasts. *EMBO J.* 4 (7) 1855-1860.
- Mayor, S., Presley, J.F. y Maxfield, F.R.** (1993). Sorting of membrane components from endosomes and subsequent recycling to the cell surface occurs by a bulk flow process. *J. Cell Biol.* 121 (6) 1257-1269.
- Mazón, M.J., Behrens, M., Morgado, E. y Portillo, F.** (1993). Low activity of the yeast cAMP-dependent protein kinase catalytic subunit Tpk3 is due to the poor expression of the *TPK3* gene. *Eur. J. Biochem.* 213, 501-506.
- Mazón, M.J., Gancedo, J.M. y Gancedo, C.** (1982). Inactivation of yeast fructose-1,6-bisphosphatase: *In vivo* phosphorylation of the enzyme. *J. Biol. Chem.* 257 (3) 1128-1130.
- Mellman, I. Fuchs, R. and Helenius, A.** (1986). Acidification of the endocytic and exocytic pathways. *Ann. Rev. Biochem.* 55: 663-700.
- Mori, S., Hedin, C.-H. y Claesson-Welsh, L.** (1992). Ligand-induced polyubiquitination of the platelet-derived growth factor b-receptor. *J. Biol. Chem.* 267 (9) 6429-6434.
- Murakami, Y., Matsufuji, S., Kameji, T., Hayashi, S.-I., Iagrashi, K., Tamura, T., Tanaka, K. y Ichichara, A.** (1992). Ornithine descarboxylase is degraded by the 26S proteasome without ubiquitination. *Nature* 360, 597-599.
- Payne, G.S., Baker, D., Van Tuinen, E. y Scheckman, R.** (1988). Protein transport to the vacuole and receptor-mediated endocytosis by clathrin heavy chain-deficient yeast. *J. Cell Biol.* 106, 1453-1461.
- Pringle, J.R., Adams, A.E.M., Drubin, D.G. y Haarer, B.K.** (1991). Immunofluorescence methods for yeast. *Methods Enzymol.* 194, 565-602.
- Ramos, J. y Cirillo, V.P.** (1989). Role of cyclic-AMP-dependent protein kinase in catabolite inactivation of the glucose and galactose transporters in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* 171, 3545-3548.
- Ramos, J. y Rodríguez-Navarro, A.** (1986). Regulation and interconversion of the potassium transport systems of *Saccharomyces cerevisiae* as revealed by rubidium

- transport. Eur. J. Biochem. 154, 307-311.
- Ramos, J., Contreras, P. y Rodríguez-Navarro, A.** (1985). A potassium transport mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. Arch. Microbiol. 143, 88-93.
- Ramos, J., Haro, R. y Rodríguez-Navarro, A.** (1990). Regulation of potassium fluxes in *Saccharomyces cerevisiae*. Biochim. Biophys. Acta 1029, 211-217.
- Ramos, J., Haro, R., Alijo, R. y Rodríguez-Navarro, A.** (1992). Activation of the potassium uptake system during fermentation in *Saccharomyces cerevisiae*. J. Bacteriol. 174, 2025-2027.
- Raths, S., Rohrer, J., Crausaz, F. y Riezman, H.** (1993). *end3* and *end4*: two mutants defective in receptor-mediated and fluid-phase endocytosis in *Saccharomyces cerevisiae*. J. Cell Biol. 120 (1) 55-65.
- Rechsteiner, M.** (1991). Natural substrates of the ubiquitin proteolytic pathway. Cell 66, 615-618.
- Riezman, H.** (1985). Endocytosis in yeast: several of the yeast secretory mutants are defective in endocytosis. Cell 40, 1001-1009.
- Riezman, H.** (1993). Yeast endocytosis. Trends Cell Biol. 3, 273-277.
- Rivett, J.A.** (1993). Proteasomes: multicatalytic proteinase complexes. Biochem. J. 291, 1-10.
- Robinson, M.S.** (1994). The role of clathrin, adaptors and dynamin in endocytosis. Curr. Op. Cell Biol. 6, 538-544.
- 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.
- Rodman, J.S., Mercer, R.W. and Stahl, P.D.** (1990). Endocytosis and transcytosis. Curr. Opin. Cell Biol. 2, 664-672.
- Rodríguez-Navarro, A. y Ramos, J.** (1984). Dual system for potassium transport in *Saccharomyces cerevisiae*. J. Bacteriol 159, 940-945.
- Rogers, S., Wells, R. y Rechsteiner, M.** (1986). Aminoacid sequences common to

- rapidly degraded proteins: the PEST hypothesis. *Science* 234, 364-368.
- Rohrer, J., Bénèdetti, H., Zanolari, B. y Riezman, H.** (1993). Identification of a novel sequence mediating regulated endocytosis of the G protein-coupled a-pheromone receptor in yeast. *Mol. Biol. Cell* 4, 511-521.
- Rose, M., Entian, K-D, Hofmann, L., Vogel, R.F. y Mecke, D.** (1988). Irreversible inactivation of *Saccharomyces cerevisiae* fructose-1,6-bisphosphatase independent of protein phosphorylation at Ser¹¹. *FEBS Lett.* 241 (1,2) 55-59.
- Roskoski, R.Jr.** (1983). Assays of protein kinase. *Methods Enzymol.* 99, 3-6.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. y Maniatics, T.** (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual.* 2^a ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Scheffner, M., Huibregtse, J.M., Vierstra, R.D. y Howley, P.M.** (1993). The HPV-16E6 and E6-AP complex functions as a ubiquitin-protein ligase in the ubiquitination of p53. *Cell* 75, 495-505.
- Schmid, S.L.** (1992). The mechanism of receptor mediated endocytosis: more questions than answers. *BioEssays* 14, 589-596.
- Schork, S.M., Bee, G., Thumm, M. y Wolf, D.H.** (1994). Site of catabolite inactivation. *Nature* 369, 283-284.
- Serrano, R.** (1977). Energy requirements for maltose transport in yeast. *Eur. J. Biochem.* 80, 97-102.
- Serrano, R.** (1983). *In vivo* glucose activation of the yeast membrane ATPase. *FEBS Lett.* 156, 11-14.
- Serrano, R.** (1988a). H⁺-ATPase from plasma membranes of *Saccharomyces cerevisiae* and *Avena sativa* roots: purification and reconstitution. *Methods Enzymol.* 157, 533-544.
- Serrano, R.** (1988b). Structure and function of proton translocating ATPase in plasma membranes of plant and fungi. *Biochim. Biophys. Acta* 947, 1-28.
- Serrano, R. y DelaFuente, G.** (1974). Regulatory properties of the constitutive hexose transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biochem.* 5, 161-171.

- Sherman, F., Fink, G.R. y Hicks, J.B.** (1983). *Methods in yeast genetics*. Cold Spring Harbor. New York.
- Simeon, A., Van der Klei, I.J., Veenhuis, H. y Wolf, D.H.** (1992). Ubiquitin, a central component of selective cytoplasmic proteolysis, is linked to proteins residing at the locus of non-selective proteolysis, the vacuole. *FEBS Lett.* 301 (2) 231-235.
- Singer, B. y Riezman, H.** (1990). Detection of an intermediate compartment involved in transport of α -factor from the plasma membrane to the vacuole in yeast. *J. Cell. Biol.* 110, 1911-1922.
- Spormann, D.O., Heim, J. y Wolf, D.H.** (1992). Biogenesis of the yeast vacuole. The precursor forms of the soluble hydrolase *yscS* are associated with the vacuolar membrane. *J. Biol. Chem.* 267 (12) 8021-8029.
- Springael, J.Y. y Andre, B.** (1994). *NPI1*, a nitrogen permease inactivator protein from *S. cerevisiae*, contains a new repeat motif and is related to human E6-AP, a ubiquitin-ligase component. En: Proc. 12th Samll Meeting on Yeast Transport and Energetics, Karpacz, Poland.
- Suárez-Rendueles, P. y Wolf, D.H.** (1988). Proteinase function in yeast: biochemical and genetic approaches to a central mechanism of post-translational control in the eukaryote cell. *FEMS Microbiol. Rev.* 54, 17-46.
- Szkutnicka, K., Tschopp, J.F., Andrews, L. y Cirillo, V.P.** (1989). Sequence and structure of the yeast galactose transporter. *J. Bacteriol.* 171 (8) 4486-4493.
- Tafrov, St. y Venkov, P.** (1992). Cloning and characterization of a gene wich determines endocytosis in *Saccharomyces cerevisiae*. En: 16th Int. Conf. on Yeast Genetics and Molecular Biology.
- Teichert, U., Mechler, B., Müller, H. y Wolf, D.H.** (1989). Lysosomal (vacuolar) proteinases of yeast are essential catalysts for protein degradation, differentiation and cell survival. *J. Biol. Chem.* 264 (27) 16037-16045.
- Thomas, B.J. y Rothstein, R.** (1989). Elevated recombination rates in transcriptionally active DNA. *Cell* 56, 619-630.
- Toda, T., Cameron, S., Sass, P., Zoller, M. y Wigler, M.** (1987b). Three

- different genes in *Saccharomyces cerevisiae* encode the catalytic subunits of the cAMP-dependent protein kinase. *Cell* 50, 277-287.
- Toda, T., Cameron, S., Sass, P., Zoller, M., Scott, J.D., McMullen, B., Hurwitz, M., Krebs, E.G. y Wigler, M. (1987a).** Cloning and characterization of *BCY1*, a locus encoding a regulatory subunit of cAMP dependent protein kinase in yeast. *Mol. Cell. Biol.* 7, 1371-1377.
- Trowbridge, I.S. (1991).** Endocytosis and signals for internalization. *Curr. Op. Cell Biol.* 3, 634-641.
- Trowbridge, I.S., Collawn, J.F. y Hopkins, C.R. (1994).** Signal-dependent membrane protein trafficking in the endocytic pathway. *Annu. Rev. Cell Biol.* 9, 129-161.
- Vallejo, C. y Serrano, R. (1989).** Physiology of mutants with reduced expression of plasma membrane H⁺-ATPase. *Yeast* 5, 307-319.
- Van der Laat, J.B. y Van Solingen, P. (1974).** Cyclic 3',5'-adenosine monophosphate stimulates trehalose degradation in baker's yeast. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 56, 580-587.
- Varshavsky, A. (1992).** The N-end rule. *Cell* 69, 725-735.
- Volland, C., Urban-Grimal, D., Géraud, G. y Haguenaer-Tsapis, R. (1994).** Endocytosis and degradation of the yeast uracil permease under adverse conditions. *J. Biol. Chem.* 269 (13) 9833-9841.
- Waltschewa, L., Kotyk, A. y Venkov, P. (1991).** Increased endocytosis in the *Saccharomyces cerevisiae* fragile mutant VY1160. *Yeast* 7, 211-217.
- Wichmann, H., Henst, L. y Gallwitz, D. (1992).** Endocytosis in yeast: evidence for the involvement of a small GTP-binding protein (Ypt7p). *Cell* 71, 1131-1142.

ANEXO

Turnover of the K^+ transport system in *Saccharomyces cerevisiae*

Begoña Benito, Enriqueta Riballo and Rosario Lagunas

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

Received 30 September 1991

The stability of the K^+ transport system in *Saccharomyces cerevisiae* has been studied upon inhibition of protein synthesis with cycloheximide. Addition of the antibiotic gave rise to an inactivation of this transport. This activation followed first-order kinetics and was stimulated by the presence of a fermentable substrate. A half-life of about 4 h could be calculated in the presence of glucose. The results indicate that, similarly to sugar carriers, K^+ transport system is less stable than the bulk of proteins of this organism.

K^+ transport; Protein turnover; Plasma membrane ATPase; *Saccharomyces cerevisiae*

1. INTRODUCTION

Most enzymes in *Saccharomyces cerevisiae* are fairly stable in maintaining their catalytic activities for long periods under different metabolic conditions [1–4]. Sugar transport systems behave differently in this respect since a rapid inactivation is observed upon inhibition of protein synthesis [4]. This inactivation, that follows first-order kinetics indicating half-lives in the range of 1–5 h for these carriers [5–8], is an energy-dependent process stimulated by fermentable substrates. The characteristics of this inactivation suggest that it is due to proteolysis of these proteins [5–8]. To see whether a low stability is a peculiarity of the sugar transports or also affects other carriers of the yeast plasma membrane we have investigated the stability of the K^+ transport system.

K^+ transport has been extensively studied in *S. cerevisiae* [9–11]. This transport is dependent on plasma membrane potential [12] and exists in two interconvertible forms with different kinetic constants depending on the K^+ content of the cells [13,14]. To investigate the stability of this carrier we have followed its activity upon inhibition of protein synthesis by addition of cycloheximide.

2. MATERIALS AND METHODS

Cycloheximide, MES, diethylstilbestrol and ATP were from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO). All other reagents were of analytical grade. Strain ATCC 42407 was grown aerobically with 2% glucose in minimal medium as previously described [15]. Strains RS-514 (MAT a, ade1-100, his4-519, leu 2-3,112, ura 3-52, PMA1), RS-515 (MAT a, ade1-100, his4-519, leu 2-3, 112, ura 3-52, pma1-204), RS-516 (MAT a, ade1-100, his4-519, leu 2-3,112, ura 3-52, pma1-205) constructed as described in [16] were grown with 2% glucose, 0.7% yeast nitrogen

Correspondence address: R. Lagunas, Instituto de Investigaciones Biomédicas del CSIC, Arturo Duperier 4, 28029 Madrid, Spain.

base without amino acids (Difco), 20 μ g/ml adenine, and 20 μ g/histidine buffered with 50 mM Mes-Tris, pH 6.5. Cell growth was monitored by optical absorbance measurement at 640 nm. Plasma membrane ATPase was measured in crude membrane preparations [17]. For this purpose cells were treated with glucose before homogenization as described in [18] and the enzyme activity was measured as described [17]. Protein content of the membrane preparations was determined by the method of Lowry et al. [19] after precipitation with 5% trichloroacetic acid. Activity of the K^+ transport system was measured by following Rb^+ uptake using atomic absorption spectrophotometry as described [13]. For this purpose cells were previously depleted of intracellular K^+ by incubation in the presence of NaN_3 as described in [14]. To recover the plasma membrane potential before Rb^+ uptake measurements, NaN_3 -treated cells were washed with water and incubated for 5 min in the presence of glucose as described [14]. Rb^+ uptake was started by addition of 5 mM $RbCl$. At this concentration of Rb^+ the carrier is almost saturated and the velocity measured is very close to the V_{max} [14]. Protein content of the cells was determined as described in [20].

3. RESULTS AND DISCUSSION

Addition of cycloheximide to glucose growing cells produced a decrease in the uptake of Rb^+ that followed first-order kinetics indicating a half-life for the K^+ transport system of about 3.5 h (Fig. 1A). These results are consistent with the low intracellular concentration of K^+ detected in yeast cells treated with this antibiotic [21]. When instead of glucose, ethanol was present as the energy source, the inactivation occurred at a lower rate and in this case a half-life of about 15 h could be calculated (Fig. 1B).

This decay of Rb^+ uptake could be due to the turnover of the carrier as well as to a decrease in the activity of the plasma membrane ATPase through its effect on plasma membrane potential and intracellular pH [12,22,23]. Actually a certain inactivation of this enzyme has been reported in conditions similar to the ones used in this work [24]. To check this possibility we investigated the behaviour of ATPase during our experiments.

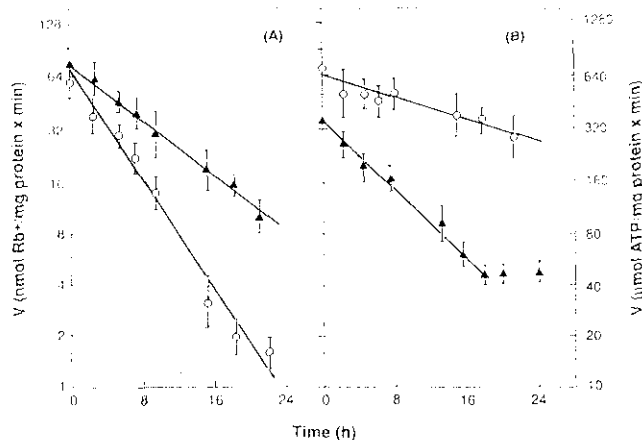


Fig. 1. Inactivation of the K^+ transport and plasma membrane ATPase upon addition of cycloheximide. Cells were harvested during exponential growth on glucose and transferred to 5 times the initial volume of fresh medium containing $10 \mu\text{g/ml}$ cycloheximide, $250 \mu\text{g/ml}$ tetracycline chlorhydrate and 2% glucose (A) or 2% ethanol (B). After incubation at 30°C for the indicated time, cells were harvested and assayed for K^+ transport (\circ) and ATPase (\blacktriangle) activities. The results are means \pm SD of 4 experiments.

We observed that addition of cycloheximide to glucose growing yeast gave rise to an inactivation of the ATPase that occurred at a lower rate than the one observed in the case of the K^+ transport system. To investigate the effect that these changes in ATPase could produce in the K^+ transport activity we used two mutants with a reduced expression of plasma membrane ATPase [16] and found that a decrease in the activity of this enzyme of as much as 60% was accompanied by a decrease in the activity of the carrier of only 25% (Table I). Similar results have been reported by Ramos et al. [12]. These results suggest that the slow decrease in ATPase activity observed upon addition of cycloheximide to glucose growing yeast ($T_{1/2}$ about 9 h) does not account for the rapid inactivation of the K^+ transport system ($T_{1/2}$ about 3.5 h) (Fig. 1A) and strongly indicate that this inactivation is mainly due to the unstability of the carrier itself. However, a much greater contribution of ATPase to the inactivation of the K^+ transport takes place when, instead of glucose, ethanol was present. This is suggested by the fact that, in this case, the inactivation of ATPase occurred at higher rate ($T_{1/2}$ about 7 h) than that of the carrier ($T_{1/2}$ about 15 h) (Fig. 1B).

In conclusion, the results shown in this work indicate that, similarly to sugar transport systems, K^+ transport system is less stable than the bulk of proteins of *S. cerevisiae* and that its instability is increased by the presence of fermentable substrates.

Rogers et al. [25] have observed that some proteins with short intracellular half-lives contain one or more regions rich in Pro (P), Glu (E), Ser (S), and Thr (T) that are flanked by positively charged amino acids. In addition, proteins containing Arg-Arg pairs are also rapidly

Table 1

Activity of the plasma membrane ATPase and the K^+ transport system in mutants with reduced expression of ATPase

Strain	ATPase activity	K^+ transport activity
RS-514 (PMA1)	100	100
RS-515 (pma1-204)	42	75
RS-516 (pma1-205)	37	72

Values are relative to those of the wild-type strain. The absolute values of the activities of the wild-type were $0.45 \mu\text{mol ATP}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ protein for ATPase and $61 \text{ nmol Rb}^+\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ protein for K^+ transport.

degraded [25]. Taking these facts into account, it has been recently predicted that K^+ transport should be a target for rapid degradation because it contains three PEST sequences and six Arg-Arg pairs [26]. Our results confirm this prediction.

Acknowledgements: We are very grateful to Dr. A. Rodriguez-Navarro for help in the Rb^+ uptake measurements and for the stimulating discussions, to Dr. R. Serrano for the gift of the ATPase mutants and to Dr. C. Gancedo for critical reading of this manuscript. This work was supported by Direcció General de Investigaci6 Científica y Técnica (PB87-0294), by Commission of the European Communities (BAP 0389E), and by Fondo de Investigaciones Sanitarias (88/1448).

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, 769-776.
- [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, 118-125.
- [6] Busturia, A. and Lagunas, R. (1985) *Biochim. Biophys. Acta* 820, 324-326.
- [7] Busturia, A. and Lagunas, R. (1986) *J. Gen. Microbiol.* 132, 379-385.
- [8] DeJuan, C. and Lagunas, R. (1986) *FEBS Lett.* 207, 256-260.
- [9] Armstrong, W.M.D. and Rothstein, A. (1967) *J. Gen. Microbiol.* 50, 967-988.
- [10] Derks, W.J.G. and Borst-Pauwels, G.W.F.H. (1980) *Biochim. Biophys. Acta* 596, 381-392.
- [11] Borst-Pauwels, G.W.F.H. (1981) *Biochim. Biophys. Acta* 650, 88-127.
- [12] Ramos, J., Haro, R. and Rodriguez-Navarro, A. (1990) *Biochim. Biophys. Acta* 1029, 211-217.
- [13] Rodriguez-Navarro, A. and Ramos, J. (1984) *J. Bacteriol.* 159, 940-945.
- [14] Ramos, J. and Rodriguez-Navarro, A. (1986) *Eur. J. Biochem.* 154, 307-311.
- [15] Lagunas, R. (1976) *Biochim. Biophys. Acta* 440, 661-674.
- [16] Vallejo, C.G. and Serrano, R. (1989) *Yeast* 5, 307-319.
- [17] Serrano, R. (1988) *Methods Enzymol.* 157, 533-544.
- [18] Serrano, R. (1983) *FEBS Lett.* 156, 11-14.
- [19] Lowry, O.H., Rosebrough, N.S., Farr, A.L. and Randall, R.J. (1951) *J. Biol. Chem.* 193, 265-271.
- [20] Jayaraman, J., Cotman, C., Mahler, H.M. and Sharp, C.V. (1966) *Arch. Biochem. Biophys.* 116, 224-252.

- [21] Connor, R., Fuhrmann, G.F. and Rothstein, A. (1970) *Biochim. Biophys. Acta* 203, 583-585.
- [22] Ulaszewski, S., van Herck, J.C., Dufur, J.P., Kulpa, J., Nieuwenhuis, B. and Goffeau, A. (1987) *J. Biol. Chem.* 262, 223-228.
- [23] Goffeau, A. (1988) *J. Med. Biol. Res.* 21, 1233-1240.
- [24] Benito, B., Moreno, E. and Lagunas, R. (1991) *Biochim. Biophys. Acta* 1063, 265-268.
- [25] Rogers, S., Wells, R. and Rechsteiner, M. (1986) *Science* 234, 364-368.
- [26] Anderson, J.A., Best, L.A. and Gaber, R.F. (1991) *Gene* 99, 30-46.

FEMSLE 06096

Involvement of endocytosis in catabolite inactivation of the K^+ and glucose transport systems in *Saccharomyces cerevisiae*

Enriqueta Riballo and Rosario Lagunas *

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

(Received 9 May 1994; revision received 27 May 1994; accepted 30 May 1994)

Abstract: The possible relationship between endocytosis and catabolite inactivation of plasma membrane proteins in *Saccharomyces cerevisiae* has been investigated. Using mutants with an increased rate of endocytosis we have shown that there is a positive correlation between the rate of endocytosis and the rate of inactivation of the K^+ and glucose transport systems. It is concluded that endocytosis is involved in catabolite inactivation of these two transport systems.

Key words: Catabolite inactivation; Endocytosis; Potassium ion transport; Glucose transport; *Saccharomyces cerevisiae*

Introduction

Most proteins in *Saccharomyces cerevisiae* are stable for long periods of time under different metabolic conditions [1]. Several plasma membrane proteins behave differently in this respect, in that a rapid and irreversible inactivation is observed upon arrest of protein synthesis [2–4]. This inactivation, that is known in the literature as catabolite inactivation [5], is dependent on energy, stimulated by fermentable substrates [2–4] and due to proteolysis [6]. Proteolysis of these proteins might occur in the plasma membrane itself or into the cell after their internalization by

endocytosis. This research attempts to see if there is a correlation between endocytosis and catabolite inactivation of the plasma membrane proteins. For this purpose we have used strains with an increased rate of endocytosis and have measured the inactivation rates of two transport systems, the K^+ and the glucose transport systems.

Materials and Methods

Cycloheximide, MES, diethylstilbestrol and ATP were from Sigma Chemical Co (St. Louis, MO). D-[U- ^{14}C]xylose was from Radiochemical Center, UK. All other reagents were of analytical grade.

The following strains have been used: 288U (*MAT α ura3 TSI*) [7], 54P (*MAT α ura3 ts1*) [7],

* Corresponding author. Tel.: (01) 585 4614; Fax: (01) 585 5487

H17 (*MAT α ura3 ts1 leu2*) (P. Venkov, personal communication); and TY17, obtained by transformation of H17 with the plasmid YIp-TS1 (*MAT α URA3 TS1 leu2*) [8]. Cells were grown aerobically at 24°C in YPD (1% yeast extract, 2% peptone, and 2% glucose, w/v). Cell growth was monitored by measuring optical densities at 640 nm. To express the *ts1* mutation, the cells were harvested by centrifugation during exponential growth, suspended in three times the initial volume of fresh medium and incubated at 35°C for 2 h [7]. Controls at 24°C were run in parallel. Inactivation of the K⁺ and glucose transports were triggered by suspending the cells in a minimal medium as described [9] in the presence of 2% glucose, 10 $\mu\text{g ml}^{-1}$ cycloheximide, and the appropriate nutrients. After incubation at 24°C or 35°C for the indicated periods in a rotatory shaker (200 rpm), K⁺ transport activity was measured as described [2]. For this purpose the cells were depleted beforehand of intracellular K⁺ by incubation in the presence of NaN₃ as described earlier [10]. Rb⁺ uptake was started by addition of 5 mM RbCl. At this concentration of Rb⁺ the transporter is almost saturated and the velocity measured is very close to the V_{max} [10]. Glucose transport was measured using xylose, a non-metabolizable analog of glucose, as substrate as described by Busturia and Lagunas [4]. For this purpose the cells were harvested, washed with 50 mM KH₂PO₄ (pH 6.0) and suspended in the same buffer. Xylose uptake was started by addition of 170 mM radioactive xylose (25 $\mu\text{Ci mmol}^{-1}$). At this sugar concentration activity of the high-affinity component of the glucose transport is measured [4]. We have focused our attention exclusively on this component because the occurrence of the low-affinity component has been questioned [11]. Plasma membrane ATPase was measured in crude membrane preparations of yeast cells treated with glucose before homogenization as described [12]. The fluid-phase endocytosis was detected as described by Dulic et al. [13] by incubating the cells in the presence of the fluorescent dye Lucifer yellow carbohydrazide (LY) for 90 min. Visualization of cell-associated LY was performed by fluorescence microscopy. A Zeiss Axiophot microscope equipped with the

following filters was used: excitation 450–490 nm, FT510, LP520. Protein content was determined after precipitation with trichloroacetic acid using the method of Lowry et al. [14].

Results and Discussion

Two temperature-sensitive strains carrying the *ts1* mutation that leads to increased rate of fluid-phase endocytosis [7] have been used in this work as well as a *TS1* strain obtained by transformation of a *ts1* mutant with an integrative plasmid carrying the *TS1* gene [8]. The *ts1* mutants showed, at 35°C, an increased internalization of LY as compared with the wild-type or the transformed cells whereas at 24°C internalization of the dye was similar in all tested strains (results not shown). When the inactivation rates of the K⁺ (Fig. 1A) and the glucose transport systems (Fig. 1B) were measured in these strains it was found that the *ts1* mutants showed, at 35°C, increased rates of inactivation as compared with the wild-type and the transformant cells whereas differences at 24°C were not observed. From the data shown in Fig. 1 it could be calculated that the half-life values of the K⁺ transport system during inactivation at 35°C were about three-fold lower in the mutants than in the wild-type or transformed cells (Table 1). Lower differences were obtained in the case of the glucose transport system (Table 1). In this case, differences of about 40% between the half-life of the transport in the mutants and in the wild-type were observed (Table 1). These differences were statistically significant ($2P < 0.05$).

These results suggest that an increase in the rate of endocytosis in *S. cerevisiae* is accompanied by an increase in the rate of inactivation of the plasma membrane transporters. However, in the case of the K⁺ transport system one alternative explanation, at least, could account for the obtained results. K⁺ transport in this organism is dependent on plasma membrane potential [15]. Therefore, the observed differences in K⁺ transport between the mutants and the wild-type and the transformed cells at 35°C (Fig. 1A) may be due not to an inactivation of the K⁺ transporter itself but to an inactivation of the plasma mem-

brane ATPase through its effect on plasma membrane potential [15]. This possibility was ruled out by the results obtained with ATPase. It was observed that 4 h under inactivating conditions at

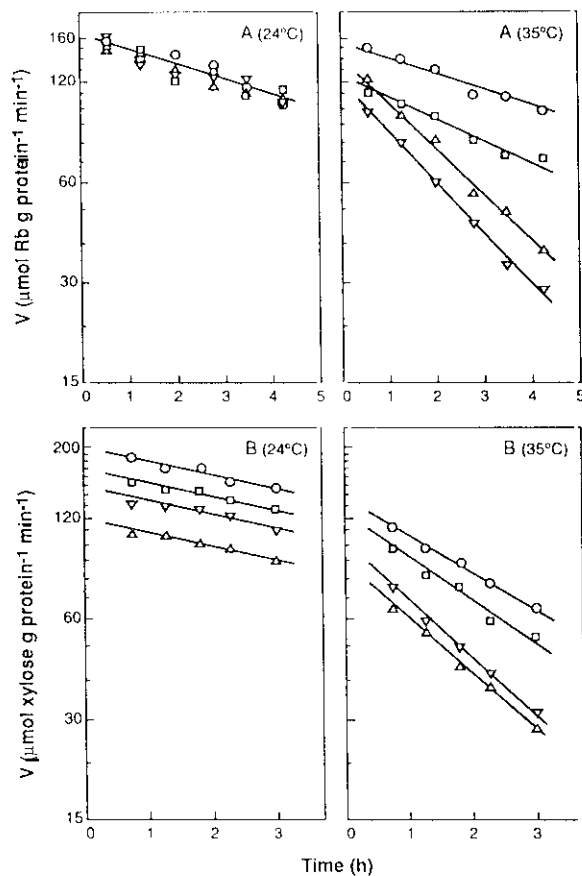


Fig. 1. Inactivation rate of the K^+ and glucose transport systems at 24°C and 35°C. Yeast cells were harvested during exponential growth at 24°C and diluted in three volumes of fresh medium. The suspension was separated into two aliquots that were incubated for 2 h at 24°C and 35°C, respectively, (see Materials and Methods). After this period the cells were harvested, suspended in the inactivating medium (see text) and incubated at the same temperature as before. At the indicated times, (A) K^+ and (B) glucose transport activity were measured. Symbols are as follows: (○) 288U (*TSl*); (▽) 54P (*tsI*); (△) H17 (*tsI*); (□) TY17 (*tsI::Ylp::TSl*). Data are mean values of 3 and 5 experiments for K^+ and glucose transport measurements, respectively. Straight lines were obtained by regression analysis. Differences between the slopes of the wild-type strain and the slopes of the mutants are statistically significant ($2P < 0.05$)

Table 1

Calculated half-life of the K^+ and glucose transport systems during the inactivation process

Strain	Half-life (h)			
	K^+ transport		Glucose transport	
	24°C	35°C	24°C	35°C
288U (<i>TSl</i>)	6.4	6.4	6.9	2.7
54P (<i>tsI</i>)	6.4	1.9	6.8	1.7
H17 (<i>tsI</i>)	6.4	2.1	6.7	1.9
TY17 (<i>tsI::Ylp::TSl</i>)	6.4	5.9	6.8	2.3

The values have been calculated from data of Fig. 1.

35°C produced a decrease of about 20% in the ATPase activity of the mutants as compared with the wild-type and the transformed cells (Table 2) and it has been shown that this low decrease has no significant effect on the K^+ transport activity [2,15].

The results reported in this work show that there is a positive correlation between the rate of endocytosis and the rate of catabolite inactivation of the K^+ and the glucose transport systems in *S. cerevisiae* and suggest that endocytosis is involved in catabolite inactivation of these transport systems.

Table 2

Activity of the plasma membrane ATPase and the K^+ transport system in yeast cells after 4 h under inactivating conditions

Strain	ATPase activity		K^+ transport activity	
	24°C	35°C	24°C	35°C
	288U (<i>TSl</i>)	100	100	100
54P (<i>tsI</i>)	97	87	103	32
H17 (<i>tsI</i>)	102	80	100	27
TY17 (<i>tsI::Ylp::TSl</i>)	100	93	100	80

Yeast cells were treated as described in Fig. 1. After 4 h of incubation in the inactivating medium at the indicated temperatures activity of plasma membrane ATPase and K^+ transport were measured. Values are relative to those of the wild-type. The absolute values of the activities of the wild-type strain at 24°C and 35°C were, respectively, 0.48 and 0.56 mmol ATP min^{-1} g protein $^{-1}$ for ATPase and 90 and 85 $\mu\text{mol Rb}^+$ min^{-1} g protein $^{-1}$ for K^+ transport.

Acknowledgements

We are very grateful to Dr. P. Venkov for the gift of strains 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 López, S. and Gancedo, J.M. (1979) Effect of metabolic conditions on protein turnover in yeast. *Biochem. J.* 178, 769-766.
- 2 Benito, B., Riballo, E. and Lagunas, R. (1991) Turnover of the K⁺ transport system in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* 294, 35-37.
- 3 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, 224-326.
- 4 Busturia, A. and Lagunas, R. (1986) Catabolite inactivation of the glucose transport system in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Gen. Microbiol.* 132, 379-385.
- 5 Holzer, H. (1976) Catabolite inactivation in yeast. *Trends Biochem. Sci.* 1, 178-181.
- 6 Lucero, P., Herweijer, M. and Lagunas, R. (1993) Catabolite inactivation of the yeast maltose transporter is due to proteolysis. *FEBS Lett.* 333, 165-168.
- 7 Waltscheva, L., Kotyk, A. and Venkov, P. (1991) Increased endocytosis in the *Saccharomyces cerevisiae* fragile mutant VY1160. *Yeast* 7, 211-217.
- 8 Tafrov, S. and Venkov, P. (1992) Cloning and characterization of a gene which determines endocytosis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. 16th Int. Conf. on Yeast Genetics and Molecular Biology.* 2-43B.
- 9 Lagunas, R. (1976) Energy metabolism of *Saccharomyces cerevisiae*. Discrepancy between ATP balance and known metabolic functions. *Biochim. Biophys. Acta* 440, 661-674.
- 10 Ramos, J. and Rodriguez-Navarro, A. (1986) Regulation and interconversion of the K⁺ transport systems of *Saccharomyces cerevisiae* as revealed by Rb⁺ transport. *Eur. J. Biochem.* 154, 307-311.
- 11 Fuhrmann, G.F. (1992) Regulation of glucose transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biotech.* 27, 1-15.
- 12 Serrano, R. (1983) In vivo glucose activation of the yeast plasma membrane ATPase. *FEBS Lett.* 156, 11-14.
- 13 Dulic, V., Egerton, M., Elguindi, I., Rath, S., Singer, B. and Riezman, H. (1991) Yeast endocytosis assays. *Methods Enzymol.* 194, 697-710.
- 14 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.
- 15 Ramos, J., Haro, R. and Rodriguez-Navarro, A. (1990) Regulation of potassium fluxes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim. Biophys. Acta* 1029, 211-217.

Rapid Report

cAMP-dependent protein kinase is not involved in catabolite inactivation of the transport of sugars in *Saccharomyces cerevisiae*

Enriqueta Riballo, María J. Mazón, Rosario Lagunas *

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

(Received 22 March 1994)

Abstract

It has been reported that catabolite inactivation of sugar transport systems in *Saccharomyces cerevisiae* requires cAMP-dependent protein kinase activity (cAPK) and that the levels of these transport systems are decreased in the absence of a functional cAPK regulatory subunit. We have re-examined these possibilities and have found that catabolite inactivation does not require cAPK activity and that normal levels of the transports occur independently from the presence of the regulatory subunit. With the available information, it is difficult to ascertain the reasons for the discrepancy between our results and the ones previously reported. The inadequacy of the method used to measure the sugar transport activities might contribute to this discrepancy.

Key words: Sugar transport; Catabolite inactivation; cAMP-dependent protein kinase; Protein kinase; (*S. cerevisiae*)

Sugar transport systems are inactivated in *Saccharomyces cerevisiae* when protein synthesis is impaired [1–5]. This inactivation, known as catabolite inactivation [6], is dependent on energy, stimulated by fermentable substrates [2–4] and due to proteolysis [7]. It has been reported that catabolite inactivation of the glucose and galactose transporters requires cAMP-dependent protein kinase activity (cAPK) [8]. This conclusion was based on the observation that mutants with markedly reduced cAPK activity did not inactivate these transporters [8]. In addition, it has been claimed that in mutants with unbridled cAPK activity, due to the presence of a non-functional regulatory subunit, the transport systems were absent or present at very low levels [8]. We initiated this work to elucidate whether or not the levels of maltose transport and its catabolite inactivation are similarly affected by mutations in the cAPK components. We found that in the case of this transport both phenomena were independent of cAPK activity. This prompted us to re-examine the reported results on the glucose and galactose transport systems. We present evidence showing that cAPK activity is not implicated either in the inactivation of these systems or in the occurrence of normal levels.

Characteristics of the strains and plasmid used are described in Table 1. Cells were grown aerobically at 30°C until late exponential growth in YP (1% yeast extract and 2% peptone (w/v)) in the presence of 3 ppm antimycin A and 2% of the sugars indicated in each case. At this stage of growth the high-affinity glucose transport is present in the cells [12,13]. Cell growth was monitored by measuring optical densities at 640 nm. Inactivation of the sugar transports was routinely achieved by suspending growing cells in an ammonium-free medium as described in Ref. [3] in the presence of 2% glucose and 250 µg/ml tetracycline chlorhydrate, to avoid bacterial growth, at a cellular density of 0.5 mg/ml (wet wt). Only when indicated in the text the inactivation conditions described in Ref. [8] were used. In this case the cells were suspended in yeast nitrogen base in the presence of 2% glucose at 2.5 mg/ml (wet wt). In both cases incubation was performed at 30°C in a rotatory shaker (200 rpm). Glucose transport was measured as described in Ref. [14] using as substrate 170 mM xylose, a non-metabolizable analogue of glucose, and incubating 30 s at 30°C. Galactose transport was measured as described in Ref. [4] using 5 mM galactose and incubating 15 s at 20°C. Maltose transport was measured as described in Ref. [15] using 4 mM maltose and incubating 15 s at 20°C. At these sugar concentrations the activities of the

* Corresponding author. Fax: +34 1 5854587.

Table 1
cAMP-dependent protein kinase activity in the strains used in this work

Strain	Genotype	Activity (nmol P _i /min per mg protein)	
		+ cAMP	- cAMP
W303-1A-pRM1-1 ^a	{ <i>MAT a ade2-1 his3-11,15 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1 can1-100</i> } <i>TPK1 TPK2 TPK3 BCY1</i>	3.5	0.34
MB23-pRM1-1 ^a	{Isogenic with W303-1A} <i>TPK1 tpk2::HIS3 tpk3::URA3 BCY1</i>	1.2	0.25
MB13-pRM1-1 ^a	{Isogenic with W303-1A} <i>tpk1::LEU2 TPK2 tpk3::URA3 BCY1</i>	1.2	0.14
MB12-pRM1-1 ^a	{Isogenic with W303-1A} <i>tpk1::LEU2 tpk2::HIS3 TPK3 BCY1</i>	0.14	0.07
238-pRM1-1 ^b	{ <i>MAT a ade leu2 ura3-52 his3 trp1 CTT1::LacZ</i> } <i>TPK1 TPK2 TPK3 BCY1</i>	2.0	0.29
242-pRM1-1 ^b	{Isogenic with 238} <i>TPK1 tpk2::HIS3 tpk3::TRP1 bcy1::LEU2</i>	1.3	1.2
243-pRM1-1 ^b	{Isogenic with 238} <i>tpk1^w tpk2::HIS3 tpk3::TRP1 bcy1::LEU2</i>	0.14	0.12

^a Strains are described in Ref. [9]. ^b Strains were obtained from K. Tatchell. All these strains were unable to grow on maltose and were transformed with the multicopy plasmid pRM1-1 that carries the *MAL1* locus [10]. cAPK activity was measured in extracts from cells exponentially growing on YP 2% maltose as described in Ref. [11].

high-affinity components of the sugar transport systems are determined [3,4,15]. We have focused our attention exclusively on these components because the occurrence of the low-affinity ones has been questioned [16,17,25]. Immunodetection of the maltose transporter was performed in crude extracts using polyclonal antibodies as previously described [7]. cAMP-dependent

protein kinase activity (cAPK) was measured using labeled [γ -³²P]ATP and the synthetic peptide kemptide as described in Ref. [11]. Protein content was determined after precipitation with trichloroacetic acid using the method of Lowry et al. [18].

Two sets of cAPK deficient mutants have been used in this work. The first set carries a wild-type *BCY1*

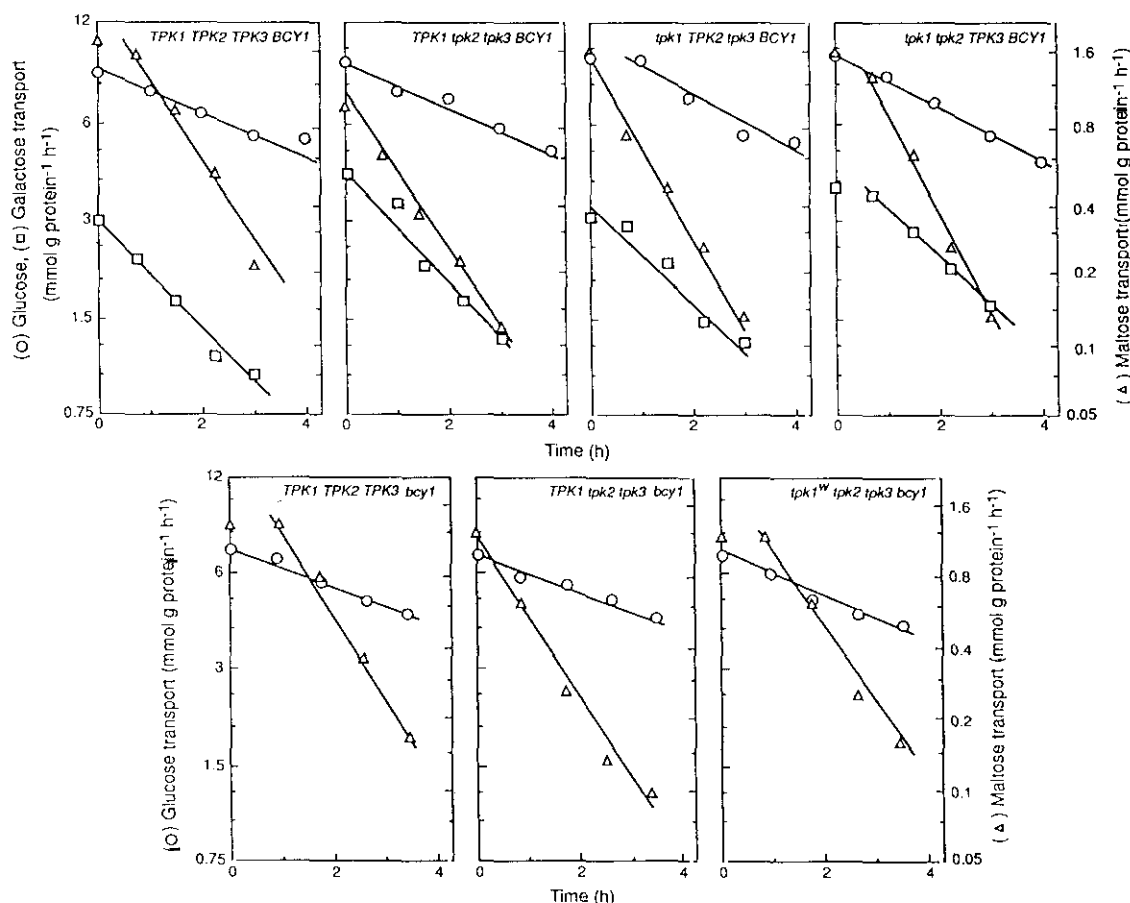


Fig. 1. Inactivation rate of sugar transports in cAPK deficient mutants. Cells were harvested at the exponential phase of growth on glucose (○), galactose (□), or maltose (Δ), washed and suspended in 3-times the initial volume of the inactivating medium. After incubation at 30°C for the indicated times cells were harvested, washed and assayed for sugar transport activities.

gene in the presence of only one of the three *TPK* genes, i.e., *TPK1* or *TPK2* or *TPK3*, respectively. The second set carries a *BCY1* gene disruption in the presence of the *TPK1* gene or a *tpk1^w* allele with markedly reduced phosphorylating activity (Table 1). Due to the mutations in the different catalytic subunits, cAPK activity in these two sets of mutants ranged between 5 and 100% of the normal value (Table 1). As expected cAPK activity was independent on the presence of cAMP in the mutants that carry the *BCY1* disrupted gene (Table 1).

In all these strains we measured sugar transport activities. As shown in Fig. 1 we found similar levels of

sugar transport activities as well as similar inactivation rates. In all strains half-life values during the inactivation process of about 5, 2 and 1 h for the glucose, galactose, and maltose transport systems could be, respectively, calculated (from data of Fig. 1). Control experiments run in parallel demonstrated that cAPK activity remained constant during the inactivation period (results not shown). These results strongly indicate that levels and inactivation of sugar transports in *S. cerevisiae* occur independently on cAPK activity. This conclusion is supported by other experiments performed with the maltose transport system in which content of the transporter instead of transport activity

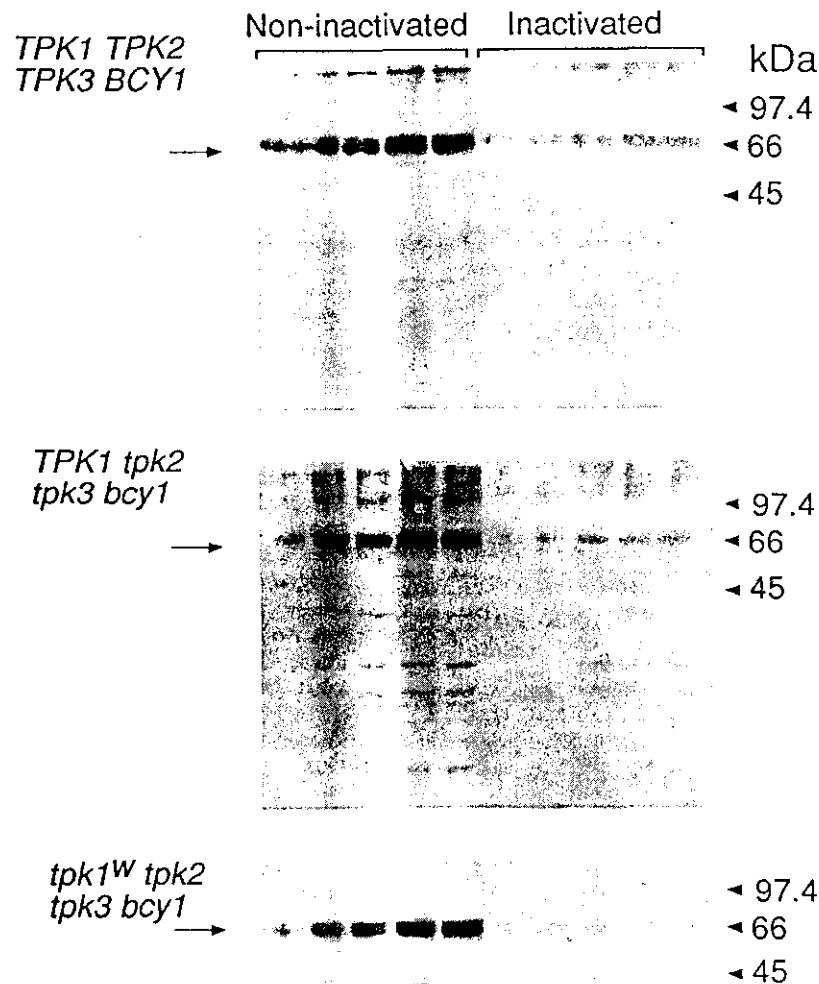


Fig. 2. Content and decrease of the maltose transporter in cAPK deficient mutants during inactivation. Cells were harvested at the exponential phase of growth, washed, and suspended as described in the text. Crude extracts were obtained immediately (non-inactivated cells) or after 3 h of incubation at 30°C (inactivated cells). Samples containing 5, 10, 15, 20, and 25 μ g protein, respectively, were analyzed using the polyclonal antibodies as described in Ref. [7]. The band corresponding to the maltose transporter is indicated by the arrow.

was measured. As shown in Fig. 2, maltose transporter showed similar levels whether a functional cAPK regulatory subunit was present or not. In addition, and as expected from the calculated half-life of this transporter, its content decreased by about 80% in 3 h of inactivation independently on the cAPK activity of the cells (Fig. 2).

Ramos and Cirillo observed no inactivation of sugar transports in mutants similar to those used in this work [8]. The reasons for the discrepancy between the results of these authors and our results are difficult to assess. This discrepancy cannot be ascribed to differences in the inactivating conditions used since experiments performed in the conditions described by these authors (see above) gave similar results to those shown in Fig. 1 (results not shown). One reason that might contribute to this discrepancy is the inadequacy of the procedures used in transport measurements. Ramos and Cirillo performed their measurements by incubating the cells in the presence of the natural substrates for 1 min at 30°C [8] and it has been shown that, in these conditions, a substantial amount of the transported sugar may be lost in the medium as fermentation products [15]. The recommended incubation period with the natural substrates at this temperature is only 5 s [17,19].

All sugar transporters so far identified in *S. cerevisiae* contain cAPK substrate sites [20–24]. Although our results indicate that these sites are not involved in catabolite inactivation they might be involved in other regulatory mechanisms, for instance, in the reversible changes of sugar transport activities occurred under certain physiological conditions (for a review see Ref. [25]). This kind of role has been ascribed to cAPK substrate sites present in other proteins [26]. For many years it was supposed that catabolite inactivation of fructose-1,6-bisphosphatase [27,28] and isocitrate lyase [29] in *S. cerevisiae* is triggered by a cAMP-dependent phosphorylation occurred at the first step of this process [26]. However, the present view is that this phosphorylation serves instead to increase susceptibility of these enzymes to their allosteric regulatory mechanisms [26]. It might be interesting to check if a similar mechanism takes place in the regulation of sugar transporters.

We are very grateful to Dr. M. Herweijer (Gist-Brocades) for the gift of the antibodies and for critical

reading of this manuscript and to Dr. C. Gancedo for critical reading of this manuscript. This work was supported by Dirección General Científica y Técnica (PB 91-0056).

References

- [1] Matern, H. and Holzer, H. (1977) *J. Biol. Chem.* 252, 6399–6402.
- [2] Busturia, A. and Lagunas, R. (1985) *Biochim. Biophys. Acta* 820, 324–326.
- [3] Busturia, A. and Lagunas, R. (1986) *J. Gen. Microbiol.* 132, 379–385.
- [4] DeJuan, C. and Lagunas, R. (1986) *FEBS Lett.* 207, 258–261.
- [5] Cheng, Q. and Michels, C.A. (1991) *J. Bacteriol.* 173, 1871–1820.
- [6] Holzer, H. (1976) *Trends Biochem. Sci.* 1, 178–181.
- [7] Lucero, P., Herweijer, M. and Lagunas, R. (1993) *FEBS Lett.* 333, 165–168.
- [8] Ramos, J. and Cirillo, V.P. (1989) *J. Bacteriol.* 171, 3545–3548.
- [9] Mazón, M.J., Behrens, M., Morgado, E. and Portillo, F. (1993) *Eur. J. Biochem.* 213, 501–503.
- [10] Rodicio, R. (1986) *Curr. Genet.* 11, 235–241.
- [11] Behrens, M.M. and Mazón, M.J. (1988) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 151, 561–567.
- [12] Bisson, L. and Fraenkel, D.G. (1984) *J. Bacteriol.* 159, 1013–1017.
- [13] Walsh, M.C., Smits, H.P., Scholte, M. and Van Dam, K. (1994) *J. Bacteriol.* 176, 953–958.
- [14] Serrano, R. and DelaFuente, G. (1974) *Mol. Cell. Biochem.* 5, 161–171.
- [15] Serrano, R. (1977) *Eur. J. Biochem.* 80, 97–102.
- [16] Benito, B. and Lagunas, R. (1992) *J. Bacteriol.* 174, 3065–3069.
- [17] Fuhrmann, G.F. (1992) *J. Biotechnol.* 27, 1–15.
- [18] Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J. (1951) *J. Biol. Chem.* 193, 267–275.
- [19] Bisson, L.F. and Fraenkel, D.G. (1983) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80, 1730–1734.
- [20] Celenza, J.L., Marshal-Carlson, L. and Carlson, M. (1988) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 85, 2130–2134.
- [21] Cheng, Q. and Michels, C.A. (1989) *Genetics* 123, 477–484.
- [22] Szkutnicka, K., Tshopp, J.F., Andrews, L. and Cirillo, V.P. (1989) *J. Bacteriol.* 171, 4486–4493.
- [23] Kruckeberg, A.L., and Bisson, L.F. (1990) *Mol. Cell. Biol.* 10, 5903–5913.
- [24] Bisson, L.F., Coons, D.M., Kruckeberg, A.L. and Lewis, D.A. (1993) *Critical Rev. Biochem. Mol. Biol.* 28, 250–308.
- [25] Lagunas, R. (1993) *FEMS Microbiol. Rev.* 104, 229–242.
- [26] Holzer, H. (1989) *Cell. Biol. Rev.* 21, 305–319.
- [27] Müller, D. and Holzer, H. (1981) *Biochim. Biophys. Res. Commun.* 103, 926–933.
- [28] Mazón, M.J., Gancedo, J.M. and Gancedo, C. (1982) *J. Biol. Chem.* 257, 1128–1130.
- [29] López-Boado, Y.S., Herrero, P., Fernandez, T. and Moreno F. (1988) *J. Gen. Microbiol.* 134, 2499–2505.

Fe de erratas.

El título de la figura 4 (pag. 57) debería ser:

Inactivación del transportador de K^+ en presencia y ausencia de un sustrato fermentable.

El experimento que se describe en la figura 21 (pág. 101) se hizo en ausencia de cicloheximida.