

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA
MOLECULAR

BASES MOLECULARES DEL PROCESO DE INDUCCIÓN
GÉNICA POR GLUCOSA

LIDIA TOMÁS COBOS

UNIVERSITAT DE VALENCIA
Servei de Publicacions
2005

Aquesta Tesi Doctoral va ser presentada a València el dia 05 de Maig de 2005 davant un tribunal format per:

- D. Enrique Herrero Perpiñán
- D^a. Marta Casado Pinna
- D. Oliver Vincent
- D. Juan Carlos Igual García
- D. Francisco Estruch Ros

Va ser dirigida per:
D. Pascual Felipe Sanz Bigorra

©Copyright: Servei de Publicacions
Lidia Tomás Cobos

Depòsit legal:
I.S.B.N.:84-370-6243-8

Edita: Universitat de València
Servei de Publicacions
C/ Artes Gráficas, 13 bajo
46010 València
Spain
Telèfon: 963864115



UNIVERSITAT DE VALÈNCIA
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR
CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS
INSTITUTO DE BIOMEDICINA DE VALENCIA

***BASES MOLECULARES
DEL PROCESO DE INDUCCIÓN
GÉNICA POR GLUCOSA***

MEMORIA PRESENTADA POR LIDIA TOMÁS COBOS PARA OPTAR AL GRADO DE
DOCTORA EN BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

VALENCIA 2005



MINISTERIO
DE EDUCACION
Y CIENCIA



CONSEJO SUPERIOR
DE INVESTIGACIONES
CIENTÍFICAS

INSTITUTO DE BIOMEDICINA DE VALENCIA

PASCUAL FELIPE SANZ BIGORRA, Científico titular del Consejo Superior de Investigaciones científicas

CERTIFICO

Que la presente Tesis Doctoral titulada "**Bases moleculares del proceso de inducción génica por glucosa**" ha sido realizada por la Licenciada en Bioquímica **Dña. Lidia Tomás Cobos** bajo mi dirección en el Instituto de Biomedicina de Valencia del Consejo Superior de Investigaciones Científicas.

Valencia, a 10 de enero de 2005.

Fdo : Dr. Pascual Sanz Bigorra

C/ Jaime Roig, 11
46010 Valencia ESPAÑA
Telf. 96 339 17 60
Fax.: 96 369 08 00

**A mis padres,
y a mi hermana**

AGRADECIMIENTOS

Durante el recorrido de este viaje llamado tesis he contado con el apoyo de las personas que se han encontrado a mi alrededor, y gracias a ellas el camino, no siempre ni tan fácil ni tan difícil, ha resultado ser una gran y bonita aventura, tanto profesional como personalmente. Por ello, quisiera agradecerles su ayuda.

Al Dr. Pascual Sanz, mi tutor y guía de viaje, por darme la oportunidad de formar parte de su grupo de investigación y, especialmente, por transmitir su admiración por la ciencia y ser un buen ejemplo de investigador científico.

A mis "compis" del laboratorio por todo el tiempo que hemos compartido dentro y fuera del laboratorio. Por esos momentos irrepetibles, por estar ahí, y sobretodo por ser amigos. A Pascual, porque siempre que puede vuelve a la bancada de trabajo siendo un "compi" más. A Ada, por estar dispuesta a ayudarme en todo momento; a MC, a M^a Carmen, a Leda por nuestras "confidencias en la campana", a Rosa por continuar con los experimentos, y a Jose, por ser el hermano mayor que nunca tuve.

A mis amigos del centro, porque nos unió la ciencia y nos mantiene el cariño y la amistad. Por nuestras reuniones y momentos compartidos, gracias a Salomé, Gracia, Rosa, Paz, Yolanda, Ana Goros, Anextu, Susana, Jordi, Nacho, Toni, Hugo, Fernando y Jose Manuel.

A mis amigos "los químicos" como cariñosamente los llamo por mantener nuestro foro internauta siempre activo, porque a pesar de las distancia os he sentido muy cerca. Gracias a Alberto, Joan, Jose, Jesús, Mengual, Rovira, Timor y Xusep.

A mis amigas porque empezamos compartiendo el interés por la química y poco a poco esas sesiones de trabajo fueron formando parte de nosotras, siendo mucho más que un grupo de estudio: a Inma por tu energía y tesón en conseguir aquello que te propones; a Carol por compartir tu corazón; a Eva, por demostrar que el esfuerzo vale la pena, por creer en el "poquito pero bueno", y por nuestra "marcha del carbonato", a Beatriz, por sus consejos, por escuchar, por entender lo que hago, y por demostrar que con constancia y perseverancia los sueños pueden hacerse realidad; a Ana, por su madurez, por el consuelo que me brindan sus palabras, por las risas compartidas, por creer en mí, por estar, y porque aquí, allí o ahí siempre cuento contigo.

A Laura y Marta, por su interés en comprender lo que hago, por ayudarme a desconectar en los momentos bajos, por nuestras risas, por nuestras largas conversaciones, por nuestro "donde sea y cuando sea", por estar siempre, por ser amigas. A Laura, por todos los años que nos conocemos, por su lógica, por su fuerza y por el gran sentido del humor. A Marta, por estar ahí y ofrecerme su ayuda, por compartir nuestro continuo esfuerzo en crecer y madurar.

A Mara porque no hay distancias, por compartir su corazón, y a Roberto por su particular visión de ver las cosas y su gran interés por la ciencia.

A Ana Leal, Belén, Sofía, Carlos, Diego, Jorge, Rebeca, Miriam, Nuria, Gemma, Lucía, Pablo, Borja, Flo y Jose, por el interés y por esos momentos "no científicos" compartidos. A M^a Carmen, Maika, Bárbara y M^a Jesús por compartir las aventuras de viaje.

A Margui, La Pequeña, por su frescura, por compartir y contagiarme su entusiasmo e ilusión. A Marta mi compañera "Des Cordeliers", por nuestros descansos en claustro y por nuestras conversaciones filosóficas. A Maria por "nuestros cafés". A Sole por escuchar.

Al Dr. Pascal Ferrè y a la Dra. Fabienne Foufelle por acogerme en su laboratorio y darme la oportunidad de trabajar en él.

A todas las personas del IBV que dentro de lo posible siempre me han ayudado.

Doy las gracias a mi familia, por estar siempre a mi lado. Por su cariño y apoyo incondicional, por quererme tanto. A mi madre, a mi padre, porque son únicos. Gracias por tratar de entender y de creer lo que hago, por ofrecerme vuestra experiencia, vuestro criterio, por enseñarme que la ilusión, la humildad, el esfuerzo y el sentido del humor son parte fundamental de la vida. A Patricia, mi hermana, mi niña, mi amiga, mi confidente, mi gran apoyo. Gracias por ser como eres, por tu sonrisa, tu alegría, tu confianza, tu mirada crítica, tu admiración, gracias por todo.

Gracias a mis abuelos, primos y tíos por su constantes preocupación y admiración en todo lo que hago.

Este trabajo se ha realizado gracias a la financiación de una beca de Formación de Personal Investigador de España concedida por el Ministerio de Ciencia y Tecnología.

INDICE

	Pag:
• Abreviaturas	3
• Introducción general.....	5
Bases moleculares del metabolismo carbonado de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	
1.1.- Metabolismo de la glucosa.....	8
1.1.1.- Componentes de la ruta de inducción por glucosa....	9
1.1.2.- Componentes de la ruta de represión por glucosa....	17
1.2.- La ruta HOG.....	27
1.3.- La ruta TOR.....	32
• Objetivo del trabajo.....	39
• Resultados.....	47
Capítulo I.....	49
Capítulo II.....	81
Capítulo III.....	123
• Discusión.....	141
• Conclusiones.....	163
• Bibliografía.....	167

ABREVIATURAS

Acetyl-CoA – acetil coenzima A.

ADN – ácido desoxirribonucleico.

AMP – adenosín monofosfato.

AMPK – kinasa activada por AMP.

ATP – adenosín trifosfato.

CREB – “cAMP response element binding”.

E.Coli – *Escherichia Coli*.

S. cerevisiae – *Saccharomyces cerevisiae*.

HMG CoA-reductasa – Hidroximetilglutaril coenzimaA reductasa.

HXTs – genes que codifican para los transportadores de glucosa de *S. cerevisiae*.

LexA dominio de unión a ADN del represor LexA de *E. Coli*.

MAP kinasa – protein kinasa activada por mitógeno.

MEF2-C – “Myocyte enhancer factor 2C”.

MNNG – *N*-metil-*N*-nitro-*N*-nitrosoguanidina.

PP2A – proteín fosfatasa tipo 2A.

PP1 – proteín fosfatasa tipo 1.

SDS-PAGE – gel de electroferesis de poliacrilamida dodecil sulfato de sodio.

INTRODUCCIÓN

GENERAL

Una característica esencial de la vida de todo organismo es la adaptación constante a los cambios que tienen lugar en su entorno. Para ello, esas variaciones ambientales deben ser leídas y traducidas en respuesta fisiológica. De ahí que, los organismos hayan desarrollado diversos mecanismos de integración, de amplificación y de mantenimiento de la señal del medio. La naturaleza de los mecanismos de señalización y respuesta celular varía en función de la complejidad del organismo. Sin embargo, se puede decir que el aspecto básico de toda adaptación es de carácter universal, en el que se pueden distinguir tres grandes etapas: 1) la lectura de la señal propiciada por el entorno, 2) la transmisión de la señal recibida y, 3), la respuesta celular. Al final toda respuesta celular implica un cambio intracelular basado en el control de la expresión génica y/o actividad de proteínas, cuya función permite adecuar el metabolismo celular a las necesidades de cada momento.

La tesis aquí presentada se centra en el mecanismo de señalización por glucosa, siendo la glucosa la principal fuente de carbono y de energía para la mayoría de los organismos (4). Para el desarrollo de dicho estudio hicimos uso de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* como modelo biológico.

La levadura *Saccharomyces cerevisiae* es un microorganismo unicelular eucariota cuyos ambientes naturales suelen ser ricos en nutrientes. Durante el crecimiento en esos hábitats la composición del medio sufre variaciones drásticas tanto por el consumo de los nutrientes como por la secreción de productos al mismo. De modo que, para el mantenimiento del crecimiento celular es necesario que el metabolismo celular se ajuste continuamente a los cambios producidos. En este sentido, procesos celulares como la expresión génica y el recambio de proteínas están sujetos a los cambios nutricionales del medio, lo que indica que las levaduras tienen la capacidad de percibir, distinguir y señalar el estado de nutrientes del medio en cada momento (1).

Dado que las rutas principales de señalización presentan gran homología entre todos los organismos, y teniendo en cuenta la facilidad de manipulación que supone trabajar con la levadura *Saccharomyces cerevisiae* en el laboratorio, se puede considerar a este organismo como un buen modelo de trabajo para el estudio de la base molecular de las rutas de transducción de señal, pudiéndose extrapolar dichos resultados a organismos superiores.

BASES MOLECULARES DEL METABOLISMO CARBONADO DE *Saccharomyces cerevisiae*

1.1- METABOLISMO DE LA GLUCOSA

La glucosa es la principal fuente de carbono y energía para la mayoría de las células (4). Además de ser nutriente, se puede considerar como una “hormona de crecimiento”, ya que regula varios aspectos del crecimiento, metabolismo y desarrollo celular. En humanos, alteraciones en su metabolismo causan diversas enfermedades como es la diabetes. Conocer cómo una célula percibe y señala la presencia de glucosa, cómo la señal afecta al metabolismo celular, y cómo se optimiza el uso de la glucosa, son preguntas esenciales que aún están por resolver.

Para la levadura *Saccharomyces cerevisiae* la glucosa es la fuente de carbono y energía preferida. De ahí que la levadura haya desarrollado mecanismos que rápidamente señalizan la presencia de glucosa y que le aseguran un uso óptimo y exclusivo (1,2).

En *S. cerevisiae* la presencia de glucosa modula distintos procesos celulares, como la biogénesis de las enzimas mitocondriales, pasando así de

un metabolismo oxidativo a un metabolismo fermentativo. La regulación del metabolismo supone controlar las rutas implicadas a distintos niveles: a corto plazo se modifica la actividad de distintas proteínas, como es el caso de la inactivación por catabolito de los transportadores de galactosa y maltosa (7,8); mientras que a largo plazo se producen cambios en la actividad transcripcional. La glucosa en *S. cerevisiae* regula la expresión génica mediante dos rutas diferentes denominadas ruta de inducción y ruta de represión (3,5,6). Mediante **la ruta de represión** se inactiva la expresión génica de un gran número de genes tales como los genes responsables de la utilización de otras fuentes de carbono distintas a la glucosa, de la gluconeogénesis y la respiración. Por el contrario, mediante **la ruta de inducción** se activan los genes responsables de la utilización de la glucosa, tales como genes que codifican para enzimas glicolíticos y transportadores de glucosa, *HXTs*.

En los últimos años se han caracterizado distintos componentes de la cascada de señalización, tanto de la ruta de inducción como de la ruta de represión por glucosa (1,6). Sin embargo, el mecanismo molecular de la transducción de la señal desde el medio extracelular hasta la maquinaria transcripcional permanece desconocido.

1.1.1.- Componentes de la ruta de inducción de la expresión génica de los transportadores de glucosa de *Saccharomyces cerevisiae*

- **Los transportadores de glucosa *HXTs*.**
- **Los sensores de glucosa *Rgt2* y *Snf3*.**
- **El complejo E3 ubiquitin ligasa *Grr1*.**
- **El factor transcripcional *Rgt1*.**
- **Los moduladores negativos: *Std1* y *Mth1*.**

Los transportadores de glucosa (HXTs) de *Saccharomyces cerevisiae* pertenecen a la gran familia de proteínas transportadoras de hexosas de la que hasta ahora se han descrito 20 genes en esta levadura (*HXT1-HXT17*, *GAL2*, *SNF3* y *RGT2*) (9,10). Dada la gran cantidad de transportadores de glucosa existe redundancia funcional y ninguno es esencial para el crecimiento en glucosa. Aún así, de los 20 miembros de la familia se sabe que sólo 7 de ellos codifican para transportadores funcionales. Una cepa mutante en siete genes *HXTs* (del *HXT1* al *HXT7*) es incapaz de crecer en glucosa, fructosa o manosa y no tiene flujo glicolítico, pero la introducción de cualquiera de los siete genes *HXTs* es suficiente para recuperar el crecimiento en glucosa (11). A pesar de que cada transportador tiene una afinidad distinta por la glucosa se pueden distinguir dos sistemas de transporte: uno de baja afinidad, y otro, reprimido por glucosa, de alta afinidad. Las células de *Saccharomyces cerevisiae* sólo expresan los transportadores de glucosa adecuados a la cantidad de glucosa disponible en el medio. Esto se debe a una acción conjunta de distintos mecanismos reguladores, incluyendo una regulación transcripcional de distintos genes de *HXTs* en respuesta a la glucosa extracelular (9,12) y a la inactivación de proteínas Hxtp en determinadas condiciones (13,14).

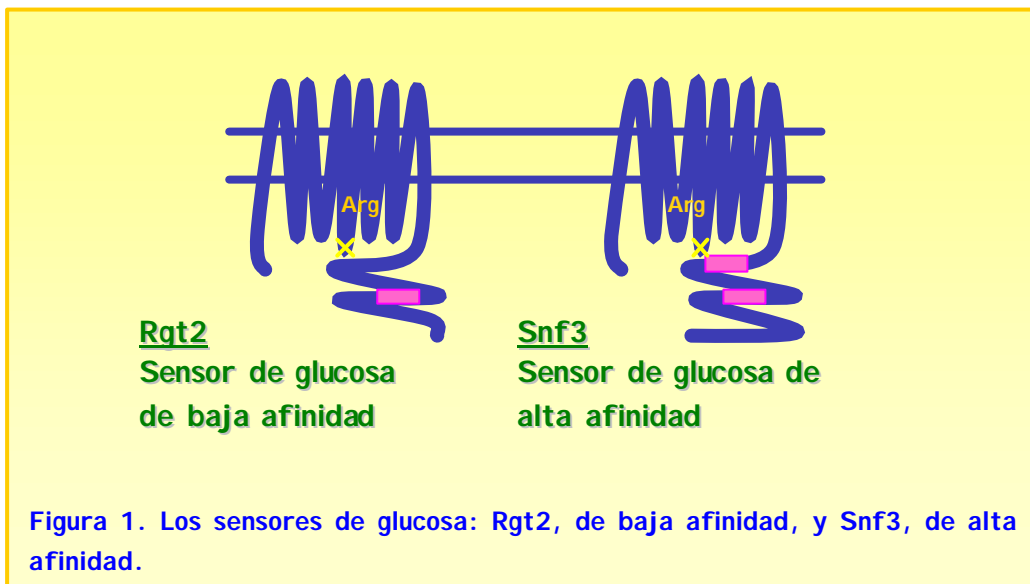
La forma en la que los genes *HXTs* se regulan a nivel transcripcional en respuesta a la cantidad de glucosa disponible es consistente con su función transportadora de alta o baja afinidad (9). Así se conoce que:

- *HXT1* codifica para un transportador de baja afinidad que se expresa en condiciones de alta glucosa ($K_m = 100$ mM).
- *HXT3* se considera un transportador de baja afinidad, que se expresa tanto a niveles altos como bajos de glucosa ($K_m = 60$ mM).
- *HXT2*, *HXT4*, *HXT6* y *HXT7* codifican para transportadores de alta afinidad y su expresión se induce en condiciones de baja glucosa ($K_m = 1-2$ mM).

La señal de inducción de la expresión de los *HXTs* se genera a través de dos proteínas de membrana, **Snf3** y **Rgt2** (1). Dada la función que desempeñan estas moléculas se denominan **sensores de glucosa**, y como ya se indica anteriormente pertenecen a la gran familia de transportadores de hexosas. Aunque cabe destacar que estas moléculas no son capaces de transportar glucosa al interior celular (2, 15).

Los genes *RGT2* y *SNF3* codifican para proteínas que se caracterizan por tener 12 dominios transmembrana (al igual que los transportadores *HXTs*) y un dominio citoplasmático extremadamente largo, 341 aminoácidos en el caso de Snf3, y 218 aminoácidos para Rgt2 (frente los 50 aminoácidos de un transportador Hxt). Aunque las proteínas Rgt2 y Snf3 tienen un alto grado de homología de secuencia entre sí (60%), sus dominios C-terminales presentan diferencias y tan sólo tienen en común un dominio de 25 aminoácidos; este dominio se encuentra duplicado en Snf3, mientras que en Rgt2 se halla en una única copia. Estudios preliminares demostraron que la eliminación de dicha cola citoplasmática impide la capacidad señalizadora de los sensores, calificando a este dominio en esencial para generar la señal de presencia de glucosa (16, 17). Sin embargo, no sólo este dominio C-terminal es necesario para la señalización, ya que modificaciones en otras regiones de la molécula altera la funcionalidad del sensor, como es el caso de un residuo de arginina muy conservado que se encuentra entre los segmentos transmembrana 4 y 5. Así una mutación Arg231Lys confiere a Rgt2 la capacidad de inducir la expresión de *HXT1*, transportador de baja afinidad, de manera constitutiva e independientemente de la cantidad glucosa en el medio; y a Snf3 la capacidad de inducir constitutivamente a *HXT2*, transportador de alta afinidad (9). Teniendo en cuenta el efecto causado por estas mutaciones se considera a **Rgt2** sensor de glucosa de baja afinidad y a **Snf3** sensor de glucosa de alta afinidad (Figura 1).

Aunque se desconoce el mecanismo molecular por el que se transmite la señal de glucosa, los últimos estudios parecen indicar que dicha acción tiene lugar a través de las colas citosólicas de los sensores, ya que se ha demostrado la interacción de estos dominios citosólicos con Std1 y Mth1, moléculas que participan en la regulación de la expresión de *HXT1* (18-21) (ver más adelante).



Otro componente de la ruta de inducción es **Grr1**, una proteína que forma parte de un complejo de poliubiquitinación SCF, el complejo E3 ubiquitin ligasa formado por la molécula adaptadora, Skp1, la molécula de andamiaje, Cdc53, y la proteína con dominio F-box, Grr1 (6). Los complejos SCF regulan la ubiquitinación de determinadas proteínas dianas a través de su interacción con un motivo del dominio F-box, que es específico para cada sustrato (22-24). Las proteínas una vez ubiquitinadas pueden o no iniciar la degradación en el proteosoma, opción que dependerá de cada proteína.

Los mutantes *grr1* tienen inhibida la inducción de los genes *HXTs*, y por tanto, la toma de glucosa extracelular (25). Además tienen efectos pleiotrópicos tales como morfología elongada, una resistencia elevada a metales pesados y sulfitos, un incremento en la sensibilidad a estrés osmótico y al ayuno de nitrógeno, pérdida del transporte de aminoácidos aromáticos e insensibilidad a la inactivación de la maltosa permeasa. Lo que muestra la amplia participación de Grr1 en distintos procesos celulares.

Respecto a la función que Grr1 desempeña en la regulación de la expresión de los transportadores de glucosa, los primeros estudios sugerían que Grr1 podía degradar a Rgt1, factor transcripcional que regula la expresión de *HXTs* (9). Sin embargo, posteriormente se ha observado que Grr1 no regula directamente a Rgt1, sino que inactiva a Std1 y Mth1, dos moléculas moduladoras de la represión de Rgt1 (21, 34).

Rgt1 es un factor transcripcional perteneciente a la familia de los factores transcripcionales tipo Gal4, que se caracteriza por contener un cluster Cys_6Zn_2 en el dominio amino-terminal. Los primeros estudios realizados en el mutante *rgt1* atribuyeron una doble funcionalidad a dicho factor de transcripción, definiéndolo como agente activador en presencia de glucosa y como agente represor en ausencia de glucosa (26, 27). Este criterio se basó, principalmente, en el fenotipo de un simple mutante *rgt1*, en el que el gen *HXT1* presenta una menor inducción en alta glucosa que la cepa silvestre, y los genes *HXT1-HXT4* no se encuentran reprimidos en ausencia de glucosa. Por lo que, se consideró a Rgt1 necesario para la inducción de *HXT1*, a la vez que también formaba parte del mecanismo de represión de *HXTs*.

El análisis del mecanismo de acción de Rgt1 demostró que para llevar a cabo la función represora se requiere la participación del complejo general represor Ssn6-Tup1 (35), ya que en el análisis funcional de la fusión LexA-Rgt1 se observó un comportamiento activador en condiciones de ausencia de

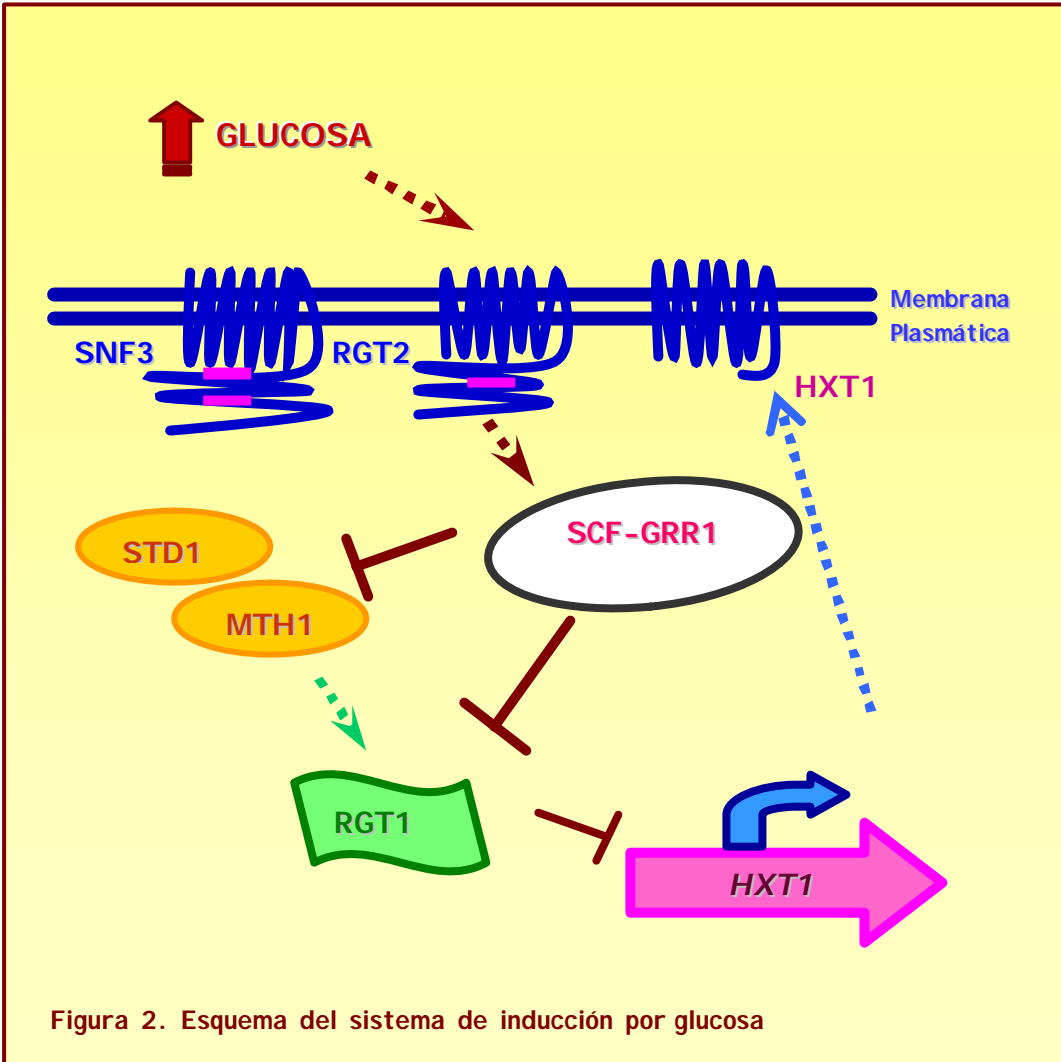
glucosa en los mutantes *ssn6* y *tup1* (26). Por ello, se postuló que Rgt1 podría modular su actividad represora/activadora a través del complejo general de represión Ssn6-Tup1. La dualidad funcional asignada al factor transcripcional Rgt1 no es un hecho celular novedoso, ya que se ha definido para otros factores de transcripción, como el factor transcripcional Ume6 (28) y, recientemente, para el factor transcripcional Sko1, cuya actividad también está directamente relacionada al complejo represor Ssn6-Tup1 (72). Considerándose este fenómeno como una estrategia celular para maximizar las condiciones de expresión en el menor tiempo posible.

Estudios posteriores indican que Rgt1 no se une al promotor de *HXT1* en condiciones de alta glucosa, sino que se asienta sobre el promotor sólo en condiciones de ausencia de glucosa (29, 30). Puesto que en estas condiciones no se induce la expresión de *HXT1* se considera que Rgt1 actúa únicamente como represor transcripcional, por lo que la función activadora de Rgt1 en condiciones de alta glucosa quedaría relegada a un efecto indirecto de no ser represor en esas condiciones y, por tanto, permitir la expresión de *HXT1*. También se ha descrito que el asentamiento de Rgt1 sobre el promotor está regulado por fosforilación y por las moléculas Std1 y Mth1, cuya presencia es requisito imprescindible para la unión al promotor (29, 33).

Otros dos componentes de la ruta de inducción de los transportadores *HXTs* son las proteínas **Mth1** y **Std1** (19, 31, 32). Estas proteínas presentan un 61% de homología entre sí y no son esenciales para el crecimiento celular. Sin embargo, mutaciones en cada una de las proteínas y sobre todo la mutación doble *std1 mth1*, desregula el patrón de expresión de los transportadores *HXTs*, siendo ésta constitutiva en un doble mutante *std1 mth1*, y considerándose, por tanto, a estas dos moléculas moduladores negativos de la expresión de los genes *HXTs* (20).

Recientemente se ha descrito que Mth1 y Std1 son necesarios para mantener al represor Rgt1 sobre el promotor de los genes *HXTs*, lo que explica su función como reguladores negativos de la expresión (33). Sin embargo, la función de estas moléculas debe ir más allá de la modulación de Rgt1, ya que, por un lado interaccionan con las colas citoplasmáticas de los sensores, concretamente Std1 interacciona con el sensor de baja afinidad, Rgt2, y Mth1, tanto con Rgt2 como con Snf3, sensor de alta afinidad (18, 20), y por otro lado, se ha observado que estas dos proteínas están sujetas a un mecanismo de degradación en condiciones de glucosa en el que está implicado Grr1 (21,34), lo que sugiere que Std1 y Mth1 forman parte de la cascada de transmisión de la señal de la membrana al núcleo.

Teniendo en cuenta los resultados descritos sobre el sistema de inducción del gen *HXT1*, el comportamiento celular ante un pulso de glucosa sería el siguiente: la señal de alta glucosa, una vez recibida por el sensor de baja afinidad Rgt2, se transmitiría al interior celular, donde a través del complejo SCF-Grr1 se modularía tanto la actividad de Std1 y Mth1 como el estado de fosforilación del factor de transcripción Rgt1. Mth1 sería degradado y Rgt1 pasaría a un estado hiperfosforilado, alzándose del promotor y permitiendo el acceso de la maquinaria transcripcional al promotor del gen *HXT1* (Figura 2).



1.1.2.- Componentes de la ruta de represión por glucosa en *Saccharomyces cerevisiae*

- **Los factores transcripcionales: Mig1/Cat8/Sip4.**
- **El complejo represor Ssn6-Tup1.**
- **El complejo kinasa Snf1.**
- **La hexoquinasa 2 (Hxk2).**
- **El complejo fosfatasa Glc7/ Reg1.**

Como se ha indicado anteriormente, mediante la ruta de represión se mantiene inactiva la expresión génica de genes que codifican para enzimas necesarias en el metabolismo de fuentes de carbono alternativas a la glucosa, entre otros. Por lo que, la ruta de represión por glucosa tiene como último objetivo modular la actividad de factores transcripcionales represores y/o activadores que en última instancia regulan la expresión génica de los genes reprimidos por glucosa (3).

Mig1 es un represor de muchos de los genes reprimidos por glucosa, como son los transportadores *HXT2* y *HXT4*, o el gen *SUC2*, entre otros (36). Este factor ejerce la represión junto al complejo general represor Ssn6-Tup1 (35). También, se han caracterizado activadores transcripcionales de los genes reprimidos por glucosa, como son los factores transcripcionales **Cat8** y **Sip4** (37).

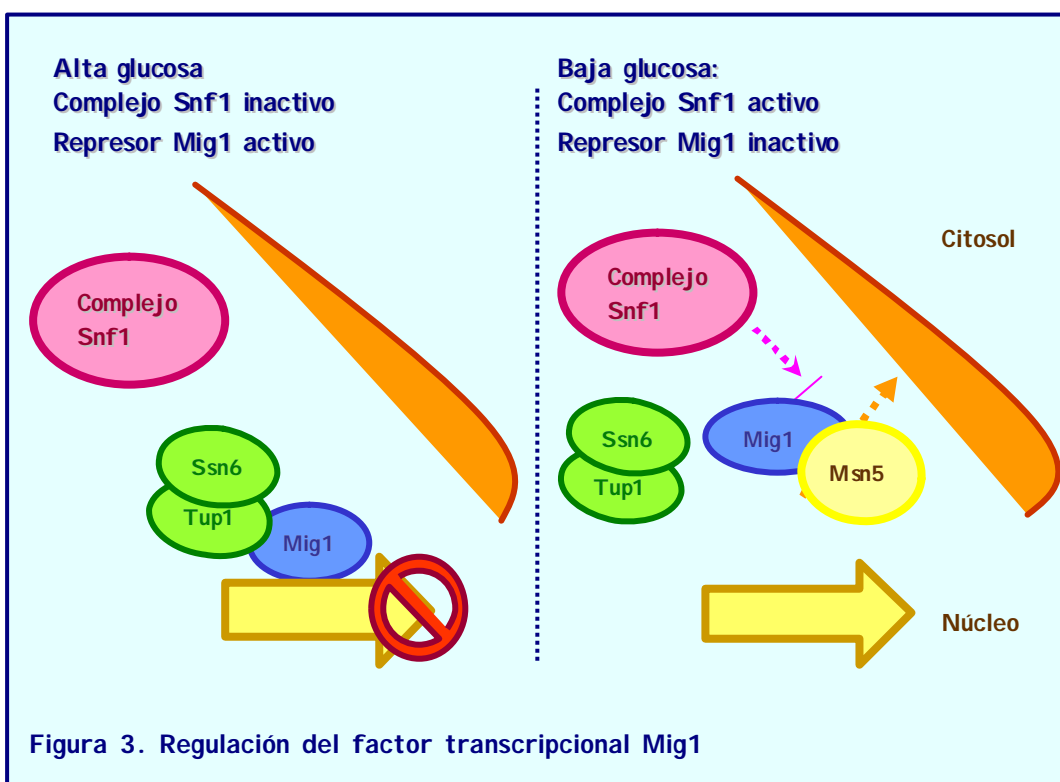
El **complejo represor de levadura Ssn6-Tup1** es un paradigma de la represión transcripcional. Ssn6 y Tup1 participan en la represión de diversas familias de genes en levadura que incluye genes regulados por glucosa (*SUC2*, *GAL*), estrés osmótico (*Sko1*), tipo celular (*MFA1*, *STE6*) y oxígeno (*DAN*, *TIP1*), entre otras señales (35, 38-40). Ni Ssn6 ni Tup1 se unen

directamente al ADN, por lo que, para su aproximación a las regiones promotoras, requieren la presencia de proteínas con capacidad de unión al ADN, y es la interacción a estas proteínas lo que le confiere especificidad de sustrato (35).

Dada la gran variedad de genes regulados por este complejo represor, se le atribuye interacciones con un componente basal de la maquinaria de transcripción o con un componente de la cromatina (38). De hecho, se han propuesto dos modelos para explicar la función de este complejo. Un modelo se basa en la asociación del complejo Ssn6-Tup1 con otros factores necesarios para la represión y que forman complejos con la holoenzima RNA polimerasa II (caso de Sin4, Sbr8, Srb10), ya que la represión observada *in vitro* requiere la presencia de la maquinaria basal de transcripción y del complejo Ssn6-Tup1. El otro modelo sugiere que el complejo Ssn6-Tup1 reprime a través de la remodelación de la estructura de la cromatina, ya que se ha demostrado una interacción *in vitro* del complejo Ssn6-Tup1 con el extremo N-terminal de las histonas H3 y H4. Así pues, el complejo Ssn6-Tup1 puede reprimir la expresión génica a través de interacciones con componentes de la cromatina que conllevan a una menor accesibilidad de las regiones del promotor. Los dos modelos no son excluyentes y una represión completa podría necesitar los dos tipos de interacciones, una con la cromatina y otra con los componentes de la maquinaria básica de transcripción. Por ejemplo, en un primer momento se podría paralizar la maquinaria y se mantendría dicha represión remodelando la cromatina.

Dentro del mecanismo de expresión de los genes reprimidos por glucosa existe un requisito imprescindible para que tenga lugar la desrepresión, y es la actividad kinasa del complejo Snf1 (3,5), ya que dicho complejo regula la actividad de los factores de transcripción que modulan la expresión de dichos genes, como es el caso de Mig1, Cat8 y Sip4 (41-43). Por

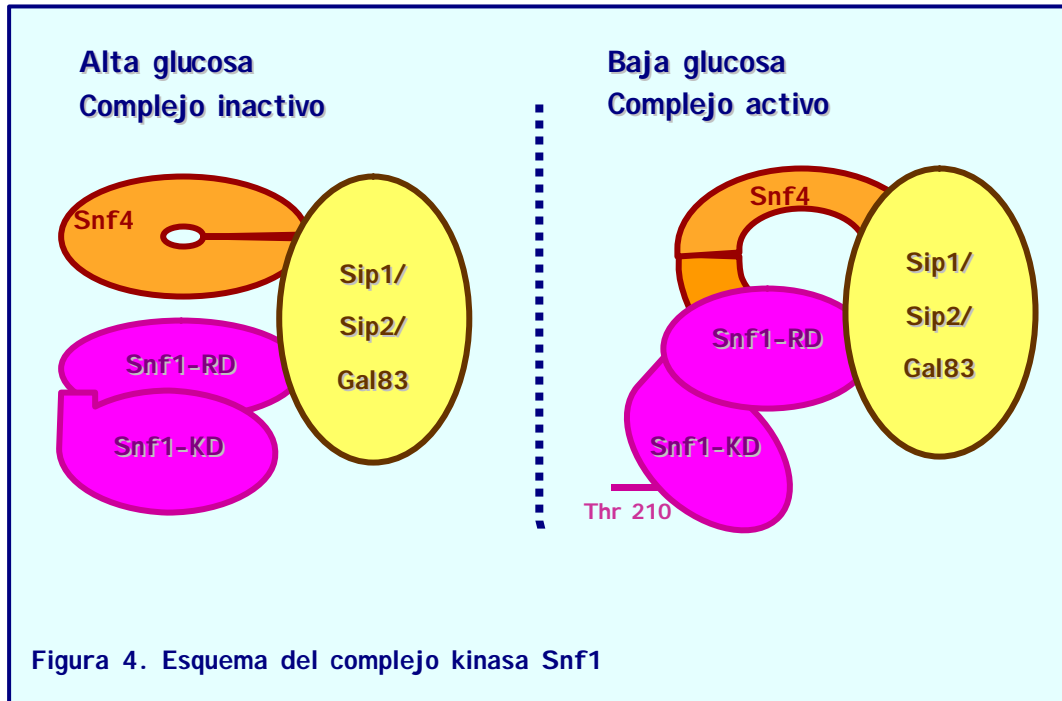
ejemplo, para el represor Mig1 la modulación de su actividad represora supone un cambio de localización celular regulado por el complejo kinasa Snf1. De modo que, en condiciones de estrés nutricional como es la ausencia de glucosa, Mig1 es fosforilado por la kinasa Snf1 y dicha fosforilación desplaza al factor del promotor y lo dirige al citoplasma vía la exportina Msn5 (Figura 3).



El **complejo kinasa Snf1** pertenece a la familia de las proteínas serín-treonín kinasas que está altamente conservada, incluyendo la kinasa activada por AMP de mamíferos y varias kinasas de plantas (45). Snf1 no sólo es esencial para la transcripción de los genes reprimidos por glucosa (1, 3, 4), como son los genes implicados en el uso de fuentes de carbono alternativas,

respiración y gluconeogénesis, sino que también se requiere para la transcripción de genes que codifican para la esporulación, acumulación de glucógeno, termotolerancia, biogénesis del peroxisoma y meiosis (46,49). Los homólogos de Snf1 en plantas también regulan el metabolismo del carbono mediante la fosforilación de enzimas metabólicas y regulación transcripcional (58). El homólogo de mamíferos, AMPK, también desarrolla una función similar en la respuesta al estrés energético (ATP/AMP). De este modo, AMPK regula enzimas metabólicas tales como la acetyl-CoA carboxilasa y la HMG-CoA reductasa (45, 51).

El complejo kinasa Snf1, al igual que su ortólogo de mamíferos, la AMPK kinasa, es un complejo trimérico (50). Está compuesto por una subunidad reguladora de la actividad kinasa, **Snf4 (g)**; la subunidad con la actividad catalítica propiamente dicha, **Snf1 (a)**, que a su vez se compone de dos dominios: un dominio regulador (RD) y un dominio catalítico (KD); y una subunidad de andamiaje **(b)** que ancla a las dos subunidades reguladora y catalítica, de la que en levaduras existen tres isoformas: **Sip1, Sip2, y Gal83**. Dada la versatilidad funcional del complejo Snf1 se supone que la subunidad β confiere especificidad de sustrato, además de dirigir al complejo a distintos compartimentos celulares (48). Se ha descrito que en condiciones de alta glucosa las tres subunidades son citoplasmáticas, mientras que en condiciones de baja glucosa, cuando el complejo es activo, algunas de las subunidades se concentran en determinados compartimentos celulares. La subunidad Gal83 dirige al complejo al núcleo, mientras que la subunidad Sip1 lo dirige a la vacuola. El complejo con Sip2 es siempre citoplasmático (53, 54).



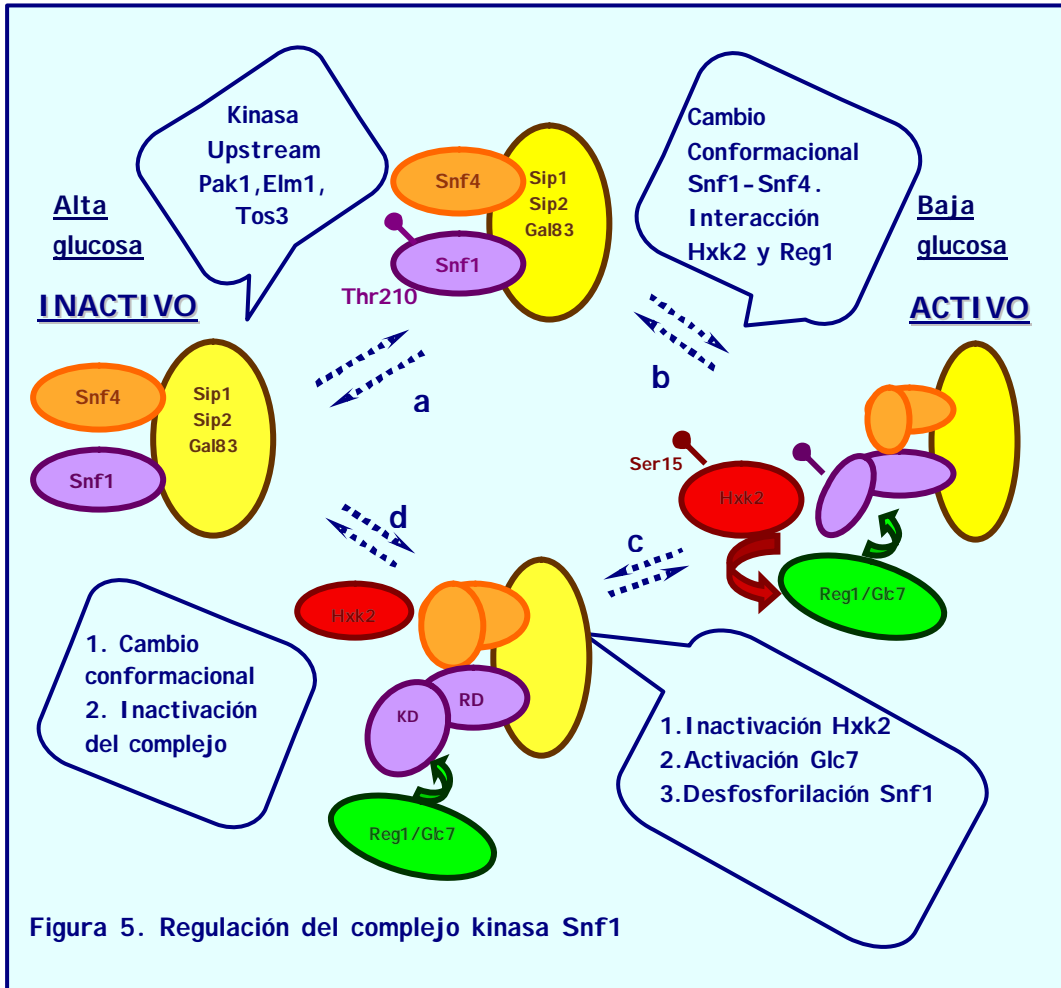
El complejo kinasa Snf1 permanece cerrado e inactivo en alta glucosa. De forma que los dominios regulador (RD) y catalítico (KD) de Snf1 interactúan entre sí y el centro activo de la subunidad catalítica es inaccesible a sus dianas. En cambio, en condiciones de estrés nutricional, la subunidad catalítica Snf1 se fosforila en el residuo de treonina 210, produciéndose un cambio conformacional en el complejo, y entonces la subunidad reguladora del complejo, Snf4, interacciona con el dominio regulador de la subunidad kinasa Snf1 (52). Entonces, los dominios KD y RD de Snf1 dejan de interactuar entre sí, quedando el dominio KD de Snf1 accesible y libre para fosforilar a sus sustratos (ver figura 4). Un aspecto importante en la regulación del complejo kinasa Snf1 es conocer a la kinasa que fosforila a Snf1. Estudios recientes han demostrado que la fosforilación y activación de Snf1 depende de tres kinasas relacionadas entre sí, Pak1, Elm1

y Tos3 (56,57). El mecanismo de acción sobre Snf1 se desconoce, pero parece ser que se trata de un mecanismo conservado, ya que, paralela a la caracterización de las kinasas de Snf1 se ha identificado a una kinasa de la AMPK de mamíferos, la kinasa supresora de tumores LKB1, que activa a AMPK *in vitro* (59). Estas kinasas, Pak1, Elm1, Tos3 y LKB1, pertenecen a la misma familia de kinasa dependientes de calmodulina.

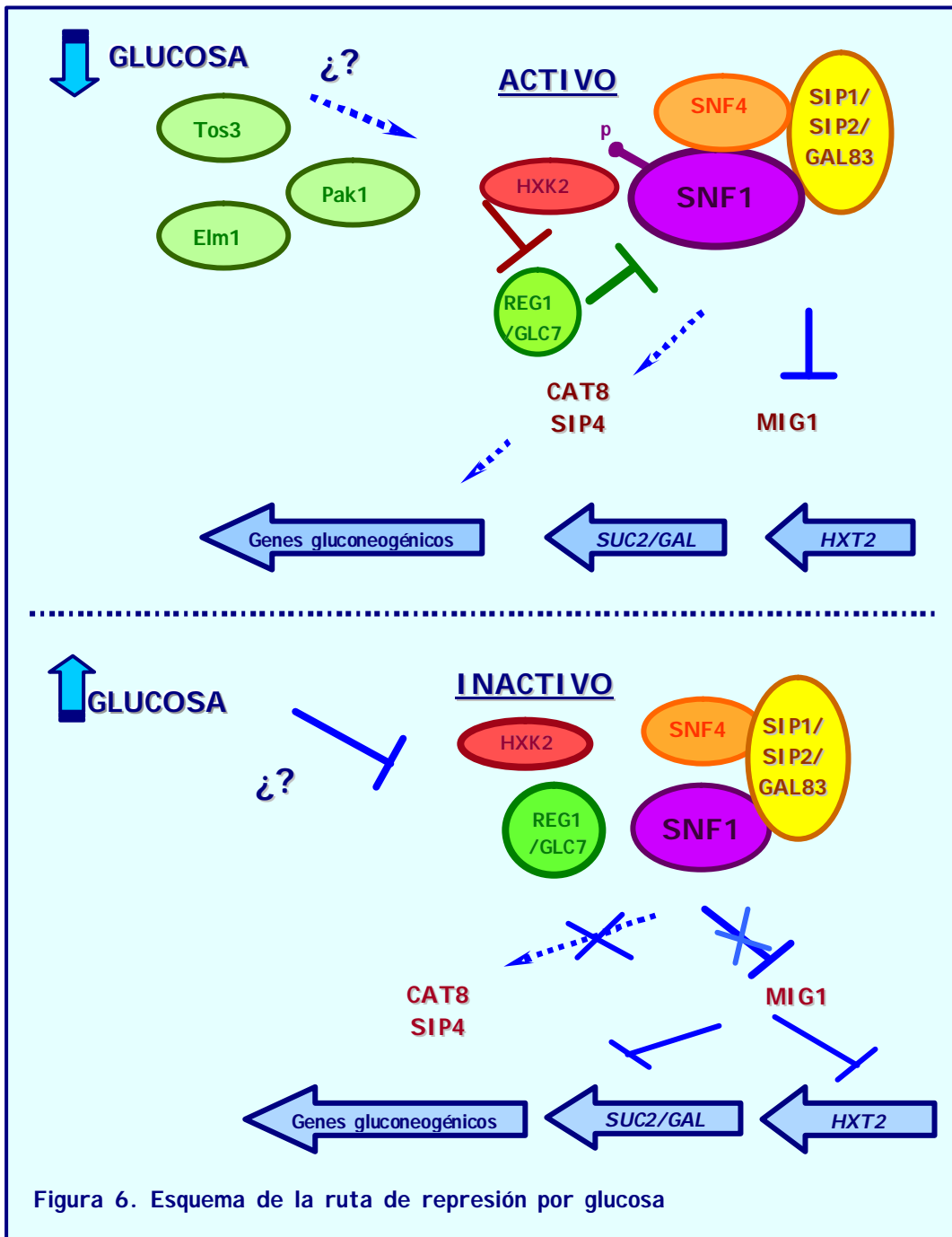
La **hexoquinasa II (Hxk2)** además de ser el primer enzima de la glicólisis y, por tanto, la encargada de fosforilar a la glucosa, forma parte del sistema de señalización por glucosa (63). Aunque la función exacta permanece desconocida evidencias genéticas parecen indicar que regula negativamente al complejo kinasa Snf1, puesto que los mutantes *hvk2* se caracterizan por tener una activación constitutiva del complejo Snf1 independientemente de las condiciones de glucosa. También se ha demostrado que la hexoquinasa II en condiciones de baja glucosa se fosforila en la serina 15 e interacciona tanto con la subunidad catalítica de Snf1 como con el complejo fosfatasa Reg1/Glc7, concretamente a través de la subunidad reguladora Reg1. Además, parece ser que la Hvk2 regula al complejo fosfatasa Reg1/Glc7, de modo que, en baja glucosa lo inactiva (55, 62).

El **complejo fosfatasa Reg1/Glc7** está formado por la subunidad catalítica, con actividad fosfatasa propiamente dicha, Glc7, perteneciente a la familia de fosfatasas tipo PP1; y la subunidad reguladora Reg1, que confiere especificidad de sustrato (60,61). El complejo regula diversos procesos celulares, y su función dentro del sistema de represión por glucosa es desfosforilar a Snf1 y, por tanto, inactivarlo en condiciones de represión (55, 62).

Aunque el mecanismo molecular de regulación por glucosa de la actividad del complejo kinasa Snf1 se desconoce, según los conocimientos disponibles se puede establecer un modelo que implica dos estados de transición intermedios. Como se muestra en la figura 5 el paso de un complejo inactivo a un complejo activo supone en primer lugar la fosforilación del residuo Thr210 por una de las kinasas, Pak1, Elm1 y Tos3 (paso a). Posteriormente tiene lugar el cambio conformacional que permite la interacción de las subunidades Snf1 y Snf4, así como la interacción de los reguladores del complejo, la hexoquinasa Hxk2 y el complejo fosfatasa Reg1/Glc7, resultando en un macrocomplejo abierto y activo (paso b). Ante la llegada de glucosa al medio tiene lugar el proceso de inactivación del complejo Snf1, en el que Hxk2 sufre un cambio conformacional dejando de interaccionar tanto con Snf1 como con el grupo fosfatasa, por tanto, el complejo Reg1/Glc7 se activa pudiendo desfosforilar a Snf1 (paso c). Finalmente, se produce el cambio conformacional del complejo kinasa volviendo al estado cerrado e inactivo (paso d).



La descripción del mecanismo de acción de la ruta de represión por glucosa teniendo en cuenta los resultados disponibles sería el siguiente (Figura 6). En condiciones de alta glucosa el sistema está inactivo, de modo que el complejo Snf1 está cerrado, sin accesibilidad a sus sustratos. Por tanto, no hay expresión génica de los genes cuyos productos se requieren para metabolizar fuentes de carbono alternativas a la glucosa. En una situación de estrés nutricional por ausencia de glucosa el sistema se activa, siendo entonces el complejo Snf1 capaz de modular la actividad de los factores transcripcionales Mig1, Sip4 y Cat8. En el mecanismo de recuperación ante un pulso de glucosa, la unión del azúcar a Hxk2 provocaría un cambio conformacional en la kinasa que la desuniría de Reg1, y, por tanto, dejaría de inhibir a la fosfatasa. Entonces la fosfatasa Glc7 sería capaz de desfosforilar a Snf1 e inactivar así al complejo, reprimiéndose nuevamente la expresión génica.



1.2- LA RUTA HOG

Como se ha indicado anteriormente la levadura *Saccharomyces cerevisiae* se caracteriza por ser capaz de adaptarse constantemente a su medio ambiente. Para responder al estrés osmótico *Saccharomyces cerevisiae* tiene distintos mecanismos de acción que implican: la producción de glicerol, la producción de proteínas protectoras del estrés, el reajuste del metabolismo de carbohidratos, de aminoácidos, de lípidos y del sistema redox (64). Por ejemplo, en el caso de un incremento exterior de osmolaridad la levadura se adapta acumulando solutos compatibles, como es el caso del glicerol, para equilibrar la presión osmótica celular con el exterior. Sin embargo, esta respuesta no se puede considerar como un efecto aislado en la célula, ya que la respuesta al estrés osmótico tiene grandes consecuencias en la fisiología celular, como son la reorganización del citoesqueleto, los cambios en la dinámica de la pared celular, la alteración en la homeóstasis iónica, los ajustes metabólicos y la parada del ciclo celular; además de tener un gran impacto en la expresión génica, donde alrededor del 10% de los genes ven afectada su expresión (65-67).

La estimulación de la expresión génica frente a un choque osmótico está mediada fundamentalmente por la **ruta HOG** ("high osmolarity glycerol (HOG) signal transduction pathway") (68).

La ruta HOG de *Saccharomyces cerevisiae* es una ruta de señalización tipo MAP kinasas altamente conservada en todos los organismos eucariotas, tanto superiores como inferiores (64). Las rutas de MAP kinasas se activan por estímulos externos y están compuestas por módulos de señalización formados por cascadas de tres proteínas kinasas que se activan secuencialmente. La activación de la ruta MAPK supone, en última instancia, la modificación de una serie de proteínas, a menudo factores de transcripción,

que permiten modular la expresión génica y así, generar una respuesta celular apropiada a los estímulos externos.

De la ruta HOG, que responde específicamente a un incremento de osmolaridad y es necesaria para la supervivencia celular en esas condiciones, se han caracterizado la mayoría de sus componentes. En el siguiente esquema se muestran los componentes conocidos de la ruta HOG comparados con sus equivalentes en una cascada de señalización de una ruta MAP kinasa:

Ruta MAP Kinasas

- Sensor/ Receptor de membrana
 - Sistema de control acoplado
 - Kinasa "upstream"
 - MAP Kinasa Kinasa Kinasa (MAPKKK)
 - MAP Kinasa Kinasa (MAPKK)
 - MAP kinasa (MAPK)
-
- Factor de transcripción

Ruta HOG

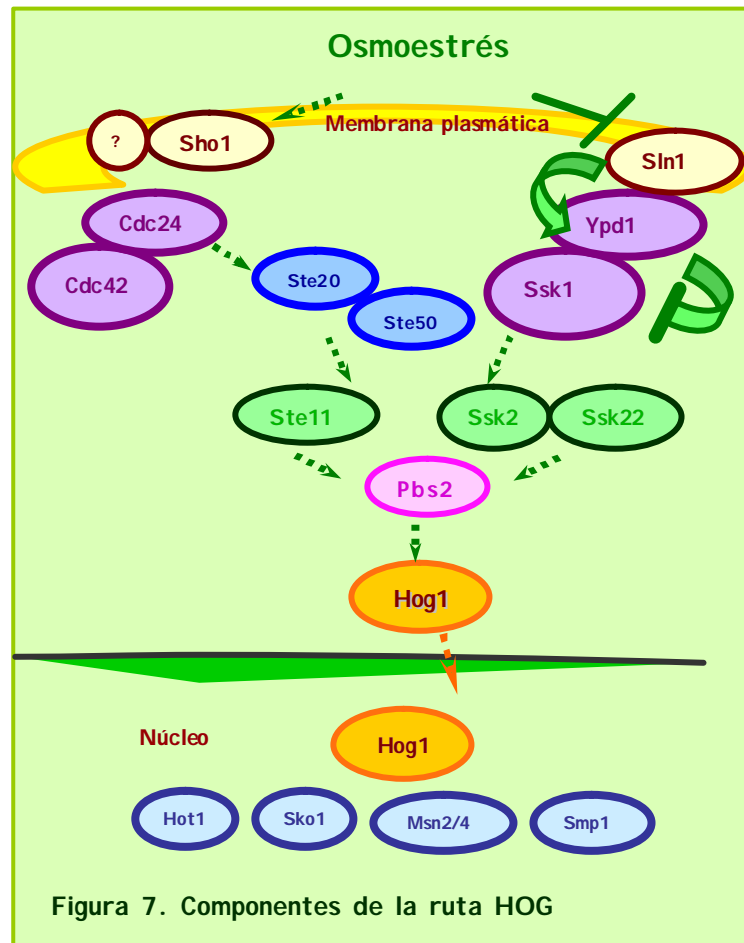


Figura 7. Componentes de la ruta HOG

La activación de la ruta HOG se realiza a través de dos sistemas de señalización diferentes: el sistema de dos componentes de la histidina kinasa Sln1 y el sistema osmosensor de Sho1. Aunque en condiciones de alta osmolaridad la función de los dos sistemas es redundante, cada uno actúa de un modo distinto. De tal forma que la rama de la kinasa Sln1 es capaz de activarse ante pequeñas variaciones en la osmolaridad extracelular, mientras que la activación de la ruta a través del osmosensor Sho1 requiere diferencias más significativas en la osmolaridad extracelular (64,68).

La señalización a través de la proteína de membrana Sln1 se basa en la transferencia de fosfato, utilizando para ello un sistema de dos componentes formado por las proteínas Ypd1 y Ssk1. En condiciones normales Sln1 se halla constitutivamente activo, y transfiere el fosfato al aceptor Ssk1 haciendo uso de la proteína intermediaria Ypd1. La fosforilación de Ssk1 impide la unión a las MAPKKK, Ssk2 y Ssk22, lo que se traduce en una inactivación de la ruta HOG. Ante un estrés osmótico, Sln1 se inactiva dejando de transferir el fosfato a Ssk1, lo que permite la interacción de esta kinasa con las MAPKKK (Ssk2 y Ssk22), activándose finalmente la MAPK Hog1 (64,68).

El mecanismo de señalización de Sho1 se efectúa a través de fosforilaciones seriadas entre los componentes de la cascada. Así pues, en condiciones de estrés hiperosmótico, vía Ste20 y Ste50 se activa a Ste11, que a su vez fosforila y activa a la MAPKK Pbs2, que finalmente activa también por fosforilación a la kinasa Hog1. Para que se desarrolle la transmisión de la señal es imprescindible que Sho1 se una a la cascada de MAP kinasas a través de su dominio SH3 del extremo C-terminal. De tal forma que Sho1 aproxima a la cascada de MAP kinasas a la membrana donde se inicia la percepción del estrés osmótico (64,68).

Una vez Hog1 es fosforilado y activado se dirige al núcleo, donde regula la expresión génica modulando la actividad de los factores de transcripción implicados en la expresión de genes de respuesta a estrés osmótico, como son los genes de síntesis de glicerol (*GPD1*, *GPP2*), los genes que codifican bomba de sodio (*ENA1*), y los genes de respuesta general a estrés (*CTT1*, *HSP12*, *STL1*). Hasta ahora, se han descrito cinco factores de transcripción que median la respuesta a estrés osmótico por la ruta HOG: Msn2 y Msn4, Hot1, Sko1 y Smp1 (64, 71). De estos factores de transcripción sólo Sko1 actúa como regulador negativo de una pequeña serie de genes inducidos por estrés. El resto de genes de respuesta a estrés osmótico están controlados por factores activadores positivos.

Msn2 y **Msn4** son factores generales de respuesta a estrés pertenecientes a la familia de factores transcripcionales de dedos de zinc. Estos factores activadores modulan la expresión génica de los genes diana uniéndose a la secuencia del promotor denominada STRE ("stress-response elements"). Al tratarse de factores generales responden a distintos tipos de estreses, por lo que su actividad está regulada por diferentes rutas de señalización. A pesar de la dificultad de estudiar el mecanismo de acción de estos factores sobre los elementos STRE, ya que se inducen fácilmente en cualquier condición de estrés, parece ser, que una forma de controlar la función de estos factores es regulando su localización celular; de forma que, la traslocación núcleo-citoplasma de estos factores está regulada estrés. En condiciones óptimas de crecimiento Msn2 y Msn4 se hallan en el citosol, mientras que en condiciones de estrés se localizan en el núcleo, donde pueden activar la expresión génica. A pesar de que no se ha descrito hasta el momento ninguna interacción física entre la MAP kinasa HOG1 y los factores Msn2 y Msn4, diversos resultados genéticos y bioquímicos han demostrado que muchos de los genes activados por Hog1 requieren la presencia de estos

factores. Entre los genes regulados por Msn2 y Msn4 se encuentran los genes de respuesta general a estrés *HSP12* y *CTT1* (69, 70).

Smp1 es un factor transcripcional de la familia de proteínas relacionadas con MEF2C. Recientemente caracterizado en la búsqueda de nuevas dianas de la ruta HOG, este factor es sustrato de la kinasa Hog1, cuya fosforilación es determinante para regular la expresión génica. Además de regular la expresión de genes en la respuesta a estrés osmótico, parece ser que también forma parte del mantenimiento de la viabilidad celular en la fase estacionaria (71).

Sko1 es un factor transcripcional perteneciente a la familia de factores transcripcionales ATF ó CREB. Tales factores poseen un dominio bZIP, cremallera de leucina para la dimerización, y un dominio básico para la activación de la transcripción. Estos elementos pueden ser activadores o represores o ambas cosas, y se unen a las secuencias CRE, elementos de respuesta a AMP cíclico de los genes que regulan (*ENA1*, *HAL1* y *GRE2*). En condiciones de no estrés osmótico, Sko1 interacciona con Tup1 y junto con el complejo represor general, Ssn6-Tup1, reprime a los genes que regula (72, 73). La actividad represora está modulada por Hog1, de modo que en condiciones de estrés osmótico Hog1 fosforila a Sko1, eliminándose su acción represora y, según estudios recientes, permitiendo la aproximación de los complejos remodeladores de la cromatina, el complejo SAGA y el complejo SWI/SNF. Lo cual, promueve a que la RNA polimerasa II se una al promotor y active la transcripción, al menos en los genes estudiados *HAL1*, *AHP1*, *GRE2* (74).

Hot1 es un factor transcripcional activador de los genes diana de Hog1, como son *HSP12*, *CTT1*, *STL1* y los genes clave para la biosíntesis del glicerol *GPD1* y *GPP2*. Su actividad está modulada por Hog1 con quien

interacciona físicamente. Esta proteína muestra similitud con las proteínas Gcr1, Msn1, Ymr111, principalmente en la región C-terminal, que engloba el dominio de unión al DNA. El modo de acción de Hot1 varía de un gen a otro, ya que, en unos casos sólo se une al promotor en caso de estrés osmótico (*SLT1*), y en otros, permanece unido al promotor tanto en presencia como en ausencia de estrés (*GPD1*). En cualquier caso, se ha visto que en presencia de estrés osmótico, Hog1 se asocia a los promotores de los genes regulados por Hot1 (*GPD1*, *STL1*, *HSP12*, *CTT1*) interaccionando con Hot1 y formando un complejo necesario para la activación transcripcional (64, 75).

1.3.- LA RUTA TOR

La ruta TOR es una ruta esencial de los organismos eucariotas considerada con un centro regulador del crecimiento celular, de modo que, si la ruta está activa significa que la célula se encuentra en un estado energético óptimo para continuar con el crecimiento celular. Así pues se podría denominar como un gran sensor del estado metabólico celular (78).

Esta ruta se definió al estudiar las dianas celulares de la rapamicina, un antibiótico macrólido con propiedades inmunosupresoras que bloquea el crecimiento y la proliferación de las células T (76), y que tiene propiedades anticancerosas (77). Dado el gran interés terapéutico de dicho antibiótico se iniciaron diversos estudios para elucidar su mecanismo de acción molecular, siendo en el organismo *Saccharomyces cerevisiae* donde se identificaron por primera vez sus dianas moleculares, dos proteínas kinasas que se denominaron TOR, "target of rapamycin" (78) y que constituyen el componente principal de la ruta.

Estudios posteriores han demostrado que la ruta TOR está conservada en todas las células eucariotas (79). En *Saccharomyces cerevisiae* son dos los genes que codifican para las proteínas TOR, *TOR1* y *TOR2*. Las proteínas que codifican estos genes tienen un alto grado de homología entre sí (67%) y un gran tamaño molecular (208 kDa). En *Schizosaccharomyces pombe* también se han caracterizado dos ortólogos, Tor1 y Tor2, que poseen entre un 42% y un 48% de homología con las proteínas de *S. cerevisiae*. En *Drosophila melanogaster* se ha identificado una proteína TOR, denominada dTOR, que tiene un 38% de homología con Tor2 de *S. cerevisiae*. En mamíferos también se ha identificado una proteína TOR, denominada mTOR, RAFT, FRAP o SEO. Esta proteína posee un gran tamaño molecular (289 kDa) y tiene un 56% de homología con las proteínas TOR de levaduras.

Las proteínas TOR pertenecen a la gran familia de kinasas relacionadas con la fosfatidilinositol-3-kinasa (79). Al igual que los demás miembros de la familia se caracterizan, además de por su gran tamaño molecular, por contener en el dominio C-terminal el dominio kinasa. Sin embargo, las proteínas TOR poseen actividad serín-treonín kinasa, por lo que no son capaces de modificar lípidos.

La presencia de rapamicina en el medio inhibe a la ruta TOR. Esto se debe a que cuando el antibiótico permeabiliza la membrana celular tiene la capacidad de unirse con alta afinidad a una proteína de 12 KDa, identificada y denominada Frp1 para *Saccharomyces cerevisiae* y FKBP12 para células de mamíferos (78). El complejo rapamicina-Frp1 es un agente inhibitorio que actúa sobre las proteínas Tor, ya que la formación del complejo ternario inhibe la actividad de estas kinasas.

En *Saccharomyces cerevisiae* aunque las proteínas TOR (Tor1p y Tor2p) son redundantes, a la proteína Tor2p se le atribuyen funciones que no

comparte con Tor1p y que son resistentes a rapamicina, como es la formación de los filamentos de actina del citoesqueleto. Se desconoce la forma en la que la rapamicina distingue los procesos en los que únicamente participa Tor2p. Pero dado que Tor2p, además de formar complejos similares a los que forma Tor1p, forma otros complejos distintos, una posibilidad sería que estos nuevos complejos no fueran reconocidos por el complejo rapamicina-Fpr1p, y, por tanto, las funciones que desempeñarían estos complejos no serían sensibles al antibiótico (80).

La ruta TOR como centro regulador del crecimiento celular participa en diversos e importantes procesos celulares, como son el inicio de la traducción de proteínas, la biogénesis de ribosomas, la autofagia, control de fosfatasa y el metabolismo de nutrientes (79).

La regulación de la actividad fosfata constituye una parte muy importante en la señalización por la ruta TOR (79,81). En *Saccharomyces cerevisiae* se han identificado como componentes de la ruta TOR a Tap42p, proteína asociada a las subunidades catalíticas de la fosfatasa tipo PP2A (Pph21 y Pph22) y a la fosfatasa Sit4, relacionada con las fosfatasas tipo PP2A. La proteína Tap42 es esencial y su asociación a sus sustratos fosforilados está regulada por la actividad de la ruta TOR, y por tanto, por la disponibilidad de nutrientes. En condiciones óptimas de crecimiento en las que la ruta TOR está activada, Tap42 se fosforila por la kinasas TOR pudiéndose entonces unir a sus dianas, la subunidad catalítica de la fosfatasa tipo PP2A. La unión de Tap42 inactiva a las fosfatasas, regulándose así la actividad de las mismas.

La participación de la ruta TOR en el metabolismo de nutrientes sucede a nivel transcripcional (82), modulando la expresión de cientos de genes implicados en distintas rutas metabólicas como son el metabolismo del

nitrógeno y la glucosa. La mayoría de los genes regulados por la ruta TOR son aquellos que participan en la toma y asimilación de diferentes fuentes de nitrógeno. Concretamente, TOR inhibe la expresión de los genes necesarios para la asimilación de fuentes pobres de nitrógeno como por ejemplo la urea y la prolina.

La ruta TOR inhibe la expresión de los genes regulados por estrés nutricional secuestrando en el citoplasma a los factores transcripcionales que activan su expresión (85). En líneas generales, en condiciones de no expresión de los genes dianas, los factores transcripcionales se encuentran en el citoplasma unidos a proteínas de anclaje citoplasmático, y dicha unión está regulada por las proteínas TOR.

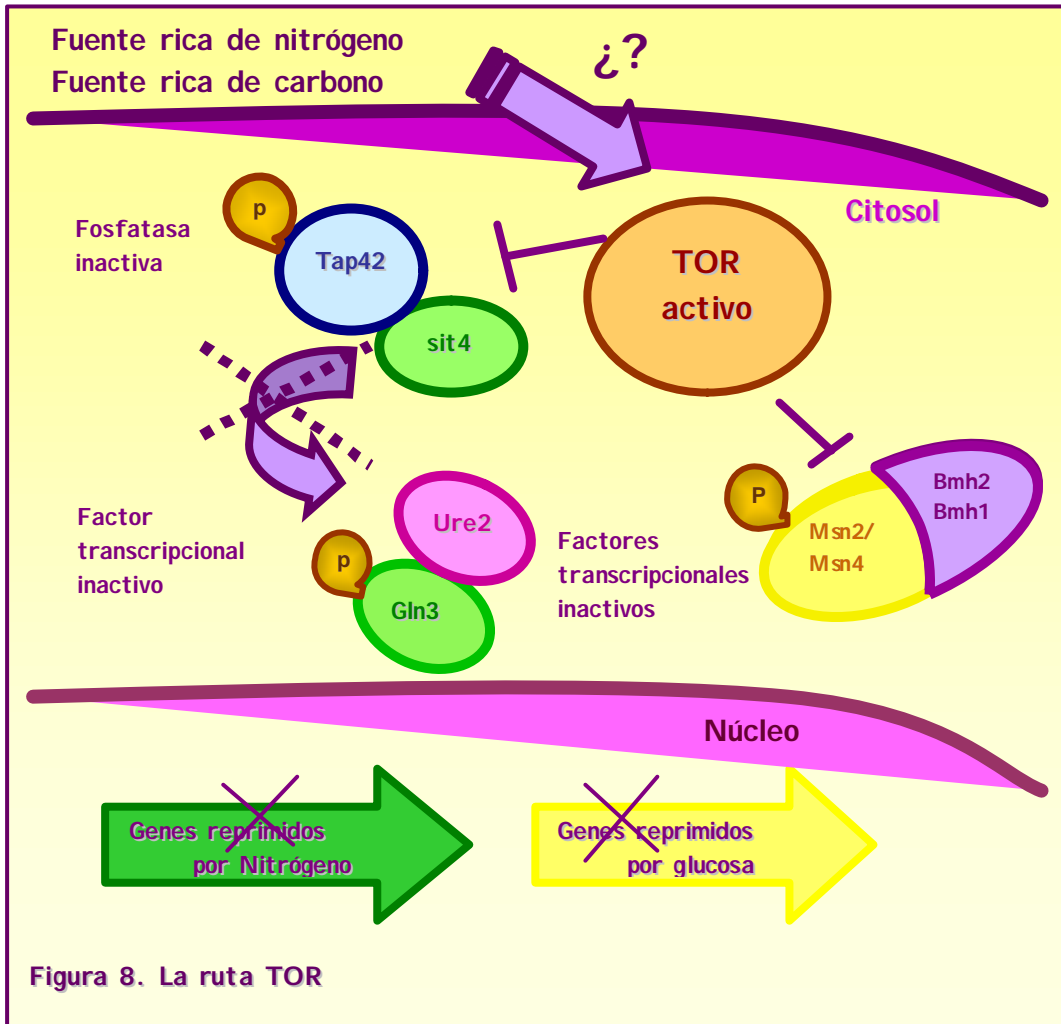
En el caso de genes regulados por fuentes pobres de nitrógeno, se han descrito al menos dos factores transcripcionales que activan su expresión: Gln3p y Gat1p. Estos factores pertenecen a la familia de factores transcripcionales GATA (secuencia que reconocen dichos factores de transcripción) y están regulados por la ruta TOR (84). La regulación del factor Gln3 es uno de los mecanismos de regulación de la ruta TOR mejor conocidos. En condiciones de fuente rica de nitrógeno, Gln3 se encuentra fosforilado y se halla en el citosol unido a la fosfoproteína Ure2, que actuaría de anclaje citosólico. En estas condiciones las proteínas TOR activas fosforilan a Tap42, que finalmente, mantiene inactiva a la fosfatasa Sit4. En cambio, en condiciones de fuente pobre de nitrógeno las proteínas TOR se inactivan y Tap42 en estado no fosforilado no se une a Sit4, de modo que la fosfatasa queda libre y activa para desfosforilar a Gln3. La desfosforilación de Gln3 permite su separación del anclaje citosólico, Ure2, y su traslocación al núcleo donde activará la expresión de sus genes diana (81, 84).

En el caso de los genes regulados por fuente de carbono, la ruta TOR participa en su regulación inhibiendo la actividad de los factores transcripcionales Msn2 y Msn4. Estos factores pertenecientes a la familia de factores tipo dedos de zinc responden a distintos tipos de estreses celulares incluyendo la limitación de fuente de carbono (69) (ver página 30). La ruta TOR regula la actividad de Msn2 y Msn4 modulando la localización celular de los mismos. Así pues, en condiciones de una fuente de carbono preferida y abundante, como es la glucosa, estos factores permanecen secuestrados en el citosol, unidos a las proteínas de anclaje Bmh1 y Bmh2 (83, 88).

Las proteínas BMHs pertenecen a la familia de proteínas 14-3-3 (86, 87, 89). Esta familia está conservada en todas las células eucariotas y participan en múltiples procesos celulares, como son: la transducción de señal, la apoptosis y ciclo celular. Estas proteínas, generalmente se encuentran en el citoplasma aunque algunas isoformas se hallan en la membrana plasmática o en el interior de algunos orgánulos como el aparato de Golgi. Actúan como homo o heterodímeros y se adhieren, principalmente, a proteínas fosforiladas, unión que se realiza sobre su superficie anfipática. En *Saccharomyces cerevisiae* participan en procesos fisiológicos esenciales tales como la exocitosis y el transporte vesicular, el desarrollo pseudohifal, la localización celular de los factores transcripcionales Msn's y Yak1, la regulación de la señalización sensible a rapamicina y la degradación de proteínas reguladas por proteosoma. La forma en la que las proteínas Bmhs participan en los procesos celulares es muy variada, ya que pueden o alterar la conformación de la proteína diana, modificando su actividad enzimática o promover la formación de complejos oligoméricos en respuesta a distintas señales, o incluso ser proteínas de anclaje citoplasmático, regulando así la localización celular y, por tanto, la función de las proteínas diana.

Otros factores transcripcionales cuya localización celular está regulada por la ruta TOR son los factores Rtg1 y Rtg3. Estas proteínas forman un heterodímero que activa la expresión de genes del ciclo de ácidos tricarbóxicos y glioxilato, participando en la síntesis de intermediarios necesarios para la síntesis de novo de algunos aminoácidos (90). Poco se conoce de la regulación de estos factores transcripcionales vía la ruta TOR; sólo que cuando la ruta TOR se inactiva se produce una acumulación de Rtg1 y Rtg3 en el núcleo (91).

En la figura 8 se muestra un esquema del posible mecanismo de acción por el que la ruta TOR regula la expresión de los genes activados por estrés nutricional. En condiciones de fuente rica de carbono y nitrógeno, por un mecanismo desconocido, el complejo TOR se halla activo y por tanto, mantiene a la fosfatasa Sit4 inactiva. Sit4 no puede desfosforilar al factor transcripcional Gln3, permaneciendo éste retenido en el citoplasma y, por tanto, no activando la expresión de los genes reprimidos por Nitrógeno. En el caso de los factores Msn2/Msn4, su regulación es independiente de la fosfatasa Sit4; en condiciones de fuente rica de carbono los factores permanecen en el citoplasma anclados a las proteínas 14-3-3, Bmh2/Bmh1. Ante un estrés nutricional, el complejo TOR se inactiva, y entonces los factores Msn2 y Msn4 se desfosforilan liberándose de Bmh2/Bmh1 y se dirigen al núcleo donde activan la transcripción de los genes diana.



***OBJETIVO
DEL TRABAJO***

El objetivo de la tesis aquí presentada es elucidar el mecanismo de señalización de la glucosa centrándonos en el siguiente punto:

- La regulación de la expresión del transportador de glucosa de baja afinidad de *Saccharomyces cerevisiae*.

Para abordar tal propósito se han desarrollado distintas estrategias de trabajo cuyos resultados están recogidos en tres capítulos en formato de artículo:

- **CAPITULO I:** Estudio de la función de la kinasa Snf1 en la expresión de *HXT1* de *Saccharomyces cerevisiae*.
- **CAPITULO II:** Estudio de la función de la ruta de respuesta a estrés osmótico en la expresión de *HXT1* de *Saccharomyces cerevisiae*.
- **CAPITULO III:** Estudio de la señal de inducción de la expresión de *HXT1* de *Saccharomyces cerevisiae*: búsqueda de nuevos componentes implicados en la regulación de la expresión de *HXT1* de *Saccharomyces cerevisiae*.

RESULTADOS

CAPITULO I :

Active Snf1 protein kinase inhibits expression of the *Saccharomyces cerevisiae* *HXT1* glucose transporter gene

Biochem. J. (2002) 368 (657–663).

Active Snf1 protein kinase inhibits expression of the *Saccharomyces cerevisiae* *HXT1* glucose transporter gene

Lidia TOMÁS-COBOS and Pascual SANZ¹ .

Instituto de Biomedicina de Valencia (CSIC), Jaime Roig 11, 46010-Valencia, Spain

Key words: glucose induction, glucose repression, two-hybrid interaction.

Abbreviations used: GFP, green fluorescent protein; GST, glutathione S-transferase; HA, haemagglutinin; SC medium, synthetic complete medium; SCF, Skp1, Cullin, F-box complex.

¹To whom correspondence should be addressed (e-mail sanz@ibv.csic.es).

ABSTRACT

Expression of *HXT1*, a gene encoding a *Saccharomyces cerevisiae* low-affinity glucose transporter, is regulated by glucose availability, being activated in the presence of glucose and inhibited when the levels of the sugar are scarce. In this study we show that Snf1 protein kinase participates actively in the inhibition of *HXT1* expression. Activation of Snf1, either by physiological conditions (growth in low-glucose conditions), or by eliminating any of its negative regulators, such as Hxk2 or Reg1, leads to an inhibition of *HXT1* expression. We also show that Std1, another known negative regulator of *HXT1* expression, interacts physically with active Snf1 protein kinase. Std1 also interacts physically with Rgt1, a transcription factor involved in *HXT1* expression, suggesting that the transcriptional properties of Rgt1 could be modulated either directly or indirectly by Std1 and Snf1 protein kinase. Finally, we show that Rgt1 interacts physically with Ssn6, a major transcriptional repressor, to regulate negatively *HXT1* expression when glucose is depleted.

Key words: glucose induction, glucose repression, two-hybrid interaction.

INTRODUCTION

In the presence of glucose, the yeast *Saccharomyces cerevisiae* represses at the level of transcription the expression of a large number of genes, including those involved in the utilization of alternative carbon sources, gluconeogenesis and respiration (see [1–3] for reviews). Biochemical and genetic studies have identified several crucial players in this pathway. Snf1 (Cat1) is a serine/threonine protein kinase that activates transcription by inhibiting transcriptional repressors (e.g. Mig1) or by stimulating transcriptional activators (e.g. Cat8 and Sip4). The Snf1 protein kinase is found in complexes containing the activating subunit Snf4 (Cat3) and members of the Sip1/Sip2/Gal83 family [4], and its activity is negatively regulated by glucose [5]. The Reg1/Glc7 protein phosphatase complex is involved in the regulation of the activity of the Snf1 kinase complex. Reg1 (Hex2) is the regulatory subunit that targets the catalytic subunit of the PP1 phosphatase (Glc7) to substrates involved in the glucose-repression pathway [6–8]. In response to a glucose signal, Glc7 (targeted by Reg1) dephosphorylates Snf1 kinase and inactivates the complex [9, 10]. In the absence of Reg1, Glc7 cannot perform its function, so the Snf1 kinase complex is constitutively in the active state, even in the presence of glucose [9, 10]. Another crucial component of the glucose-repression pathway is hexokinase PII (Hxk2). This protein participates also in the regulation of the Snf1 kinase complex by regulating the phosphorylation status of Reg1 [10].

Glucose is also able to induce the expression of several genes, such as those encoding glycolytic enzymes, ribosomal proteins and some glucose transporters (see [2, 3, 11] for reviews). *HXT1* encodes a yeast low-affinity glucose transporter whose expression is regulated by glucose availability, being activated in the presence of glucose and inhibited when levels of the sugar are scarce (see [12] for review). In the last decade, genetic and

biochemical studies have defined several components that are involved in the regulation of *HXT1* expression. Glucose availability in the surrounding medium is assessed by the sensor proteins Snf3 and Rgt2, which transmit this information to the internal cellular machinery [13, 14]. This signal is transmitted through the Skp1, Cullin, F-box complex (SCF)–Grr1 ubiquitination complex [15, 16], and finally modulates the activity of Rgt1, a transcription factor belonging to the Cys-6-zinc cluster protein family that may show three types of activity: (i) it is an activator of *HXT1* expression when glucose is abundant; (ii) it is a repressor when glucose is absent and (iii) it shows neutral activity when cells grow in low-glucose conditions [17]. Additional components of the glucose-induction pathway are Std1 and Mth1, two proteins that modulate *HXT1* expression negatively [12]; in the absence of Std1 and Mth1, the expression of *HXT1* becomes constitutive, not being inhibited when cells are growing in conditions of low or absent glucose [18]. Recent studies indicate that Std1 and Mth1 may interact with the C-terminal tails of the glucose sensors Rgt2 and Snf3 [18, 19]. The expression of *HXT1* is also affected by mutations in *HXK2* and *REG1*, genes encoding two members of the Snf1 glucose-repression pathway (see above; [12, 20]).

In this study we show that both the glucose-repression and glucose-induction pathways are interconnected in the regulation of the expression of the *HXT1* low-affinity glucose transporter gene. We observed that active Snf1 protein kinase was responsible for inhibition of *HXT1* expression when glucose was depleted.

MATERIALS AND METHODS

Strains and genetic methods

S. cerevisiae strains used in this study are listed in [Table 1](#). Strain FY250 was a gift from Dr F. Winston (Harvard Medical School, Boston, MA, U.S.A.). To construct the double mutant *reg1D snf1D*, a BamHI fragment from pUC-*snf1D::KanMX4* (see below) was used to introduce the *snf1D::KanMX4* mutated allele by gene disruption [[21](#)] in a *reg1D::URA3* strain; mutants were confirmed by PCR analysis using specific oligonucleotides. Strains *hvk1D::hisG* and *hvk2D::hisG* contained respectively fragments from nucleotide +43 to +895 (+1ATG of *HVK1*) and from nucleotide +1 to +732 (+1ATG of *HVK2*), substituted with *Salmonella typhimurium* *hisG* gene [[22](#)]. Strain *std1D::KanMX4* contained a fragment from nucleotide +412 to +1011 (+1ATG of *STD1*) substituted with the *KanMX4* module [[23](#)]. Strain CTY10-5d was a gift from Dr R. Sternglanz (State University of New York, Stony Brook, NY, U.S.A.).

Standard methods for genetic analysis and transformation were used. Yeast cultures were grown in synthetic complete (SC) medium lacking appropriate supplements to maintain selection for plasmids [[24](#)], supplemented with different carbon sources.

Oligonucleotides

In the present study we used the following oligonucleotides. STD1-1, 5´- GCCGGATCCAGATGTTTGTTCACCCACCTCCAGCAAC -3´ (+1 ATG is underlined); STD1-4, 5´- (+1370) TGGGGGAATTCGTTTTTCGCTTGTTG-3´; RGT1-1, 5´- CTCCAGGATCCTTCAAATTATGAACGAGCTC -3´ (+1 ATG is underlined); RGT1-2, 5´-(+3573) GCCCTCGAGCTGAGTCGACGGGAGAACCTGACC- 3´; RGT1-GFP, 5´-(+3516)

ACCTGTCGACAGCGGCCGCACTCGGAATCGTCCAACAGC-3'; SSN6-1, 5'-CCGGGGATCCAAATGAATCCGGGCGGTGAAC-3' (+1 ATG is underlined), and SSN6-2, 5'- (+2929) CGCTAGTCGACTAATTTTTTGAATGCAAAC-3'. The number in parentheses corresponds to the first base of the oligonucleotide with respect to ATG at position +1.

Table 1 A list of the strains used in this study

Strain	Genotype	Reference
• W303-1A (wild type)	<i>MATa ade2-1 his3-11, 15 leu2-3, 112 trp1-1 ura3-52</i>	[44]
• <i>rgt2 snf3 mth1 std1</i>	<i>std1::KanMX4</i> , derivative of MJL30 (<i>rgt2::LEU2 snf3::HIS3 mth1::TRP1</i> [19]) in W303-1A	This study
• <i>rgt2 snf3 mth1 std1 hxk1 hxk2</i>	<i>hxk1::hisG hxk2::hisG</i> , derivative of <i>rgt2 snf3 mth1 std1</i>	This study
• FY250 (wild type)	<i>MATa his3D200 leu21 trp1D 63 ura3-52</i>	From F. Winston [10]
• <i>hxk1</i>	<i>hxk1::hisG</i> , derivative of FY250	This study
• <i>hxk2</i>	<i>hxk2::TRP1</i> , derivative of FY250	[10]
• <i>hxk1 hxk2</i>	<i>hxk1D::HIS3 hxk2D::TRP1</i> , derivative of FY250	[10]
• <i>hxk1 hxk2 snf1</i>	<i>hxk1D::HIS3 hxk2D::TRP1 snf110</i> , derivative of FY250	[10]
• <i>reg1</i>	<i>reg1D::URA3</i> , derivative of FY250	[10]
• <i>snf1</i>	<i>snf1D10</i> , derivative of FY250	[10]
• <i>reg1 snf1</i>	<i>reg1D::URA3 snf1D::KanMX4</i> , derivative of FY250	This study
• CTY10-5d	<i>MATa ade2 his3 leu2 trp1 gal4 gal80 URA3::lexAop-lacZ</i>	From R. Sternglanz [10]

Plasmids

To construct plasmid pACTII-Std1 (GAD-Std1) we first amplified by PCR the coding region of the *STD1* gene using oligonucleotides STD1-1/STD1-4 (see above) and genomic DNA from strain FY250 as a template. The amplified fragment was sequenced to verify that the Taq polymerase had not introduced any undesired mutation. It was then digested with *BamHI* and *EcoRI* and subcloned into pACTII [25]. A *BamHI/Sall* fragment from pACTII-Std1 was introduced into plasmids pEG202 [26], pHW4 [10] and pSK93 [10] to obtain plasmids pEG202-Std1 (LexA-Std1), pGST-Std1 (GST-Std1) and pSK-Std1 (HA-Std1) respectively. Plasmid pACTII-Rgt1 (GAD-Rgt1) was constructed as above using oligonucleotides RGT1-1/RGT1-2; the amplified fragment was digested with *BamHI* and *XhoI* and subcloned into pACTII. A *BamHI/Sall* fragment from pACTII-Rgt1 was introduced into pEG202, pWS93 [27] and pSK93 [10] to obtain pEG202-Rgt1 (LexA-Rgt1), pWS-Rgt1 (HA-Rgt1) and pSK-Rgt1 (HA-Rgt1) respectively. Plasmid pGST-Ssn6 (GST-Ssn6) was constructed as above using oligonucleotides SSN6-1/SSN6-2; the amplified fragment was digested with *BamHI* and *Sall* and subcloned into pHW4 [10].

Plasmid pRgt1-GFP was constructed in several steps. First, we amplified by PCR the coding region of the *RGT1* gene using oligonucleotides RGT1-1/RGT1-GFP (see above); the amplified fragment was blunt-ended, subcloned into pUC18 digested with *SmaI* and dephosphorylated to obtain pUC-Rgt1-Not1. A *NotI* fragment from pSFGP1 [28] containing the green fluorescent protein (GFP) sequence was inserted into the *NotI* site of the construct, creating a C-terminal fusion between *RGT1* and GFP. An *EcoRI/Sall* fragment containing this fusion was subcloned into pRS424-ADH1, a pRS424 [29] derivative containing the *ADH1* gene promoter, to obtain finally pRgt1-GFP. The Rgt1-GFP fusion protein was fully functional since it restored the *HXT1* expression defect of *rgt1D* mutants (results not shown).

To construct the *SNF1* disruption cassette containing *KanMX4* as a selection marker, we first subcloned an *EcoRI/SalI* fragment from plasmid pRJ55 (LexA-Snf1 [5]) into pUC18, obtaining pUC-Snf1. This plasmid was digested with *NcoI*, blunt-ended with Klenow DNA polymerase and dNTPs, digested with *BglII* and then used to subclone a *Bgl II/EcoRV* fragment from plasmid pFA6a-KanMX4 [23], resulting in plasmid pUC-snf1D::KanMX4, where an inner fragment of 537bp of the *SNF1* gene was replaced by the *KanMX4* selection marker.

Other plasmids used in this study were pLexA-Snf1, pLexA-Snf1T210A, pLexA-Snf1KD (amino acids 1–391 of Snf1) and pLexA-Snf1RD (amino acids 392–633 of Snf1) [5], pWS-Snf1, pWS-Snf1T210A and pWS-Snf1K84R [30], pHXT1-lacZ [20] and pC-HXT1-lacZ [31].

Enzyme assays

Invertase activity was assayed in whole cells as described in [32]; 1 unit was defined as the amount of enzyme that released 1 μ mol of glucose/min per 100mg of yeast (dry weight) under the assay conditions (1 unit of absorbance at 600nm is equivalent to 0.860mg of cells, dry weight). β -Galactosidase activity was assayed in permeabilized cells and expressed in Miller units as in [9].

Pull-down assay

Preparation of protein extracts for pull-down assays was essentially as described previously [10]. The extraction buffer was 50mM Tris/HCl (pH7.5), 150mM NaCl, 0.1% Triton X-100, 1mM dithiothreitol and 10% glycerol, and contained 2mM PMSF and complete protease inhibitor cocktail (Boehringer Mannheim). GSH-agarose (Amersham Biosciences) was used in the pull-down assays. Pelleted proteins were analysed by Western blotting using anti-haemagglutinin (HA) monoclonal antibodies.

Immunoblot analysis

Protein samples were separated by SDS/PAGE using 10% polyacrylamide gels and analysed by immunoblotting using anti-glutathione S-transferase (GST) polyclonal (Amersham Biosciences) or anti-HA monoclonal (Boehringer Mannheim) antibodies. Antibodies were detected by enhanced chemiluminescence with ECL or ECL Plus reagents (Amersham Biosciences).

Microscope observations

Exponentially growing cultures were used to visualize GFP fusion proteins. Aliquots (2 μ l) of the cultures were put on microscope slides and covered with 18mm \times 18mm coverslips. Cells were then viewed using a Zeiss Axioskop II fluorescence microscope. Images were scanned with a SPOT digital camera (Diagnostic Instruments) and processed using Adobe Photoshop 5.0 software.

RESULTS AND DISCUSSION

1.- Activated Snf1 inhibits *HXT1* expression

As described in the Introduction, genetic studies have previously demonstrated that the expression of *HXT1* was affected in mutants lacking hexokinase PII (*hvk2* mutants; [12, 20]), one of the two hexokinases present in *S. cerevisiae*. To study the involvement of Hvk2 in *HXT1* regulation, we measured the expression of *HXT1*, as a transcriptional fusion of the *HXT1* promoter to bacterial β -galactosidase encoding the *lacZ* gene, in different hexokinase mutants. As observed in [Table 2](#), *HVK2* deletion was mainly responsible for *HXT1* inhibition, although the inhibitory effect was improved when both *HVK1* and *HVK2* genes were deleted, indicating that in the absence of Hvk2, Hvk1 could partially complement the action of Hvk2. The induction of *HXT1* by glucose was also prevented in *reg1* mutants lacking the regulatory subunit of the Reg1/Glc 7 protein phosphatase complex ([Table 2](#)). Since *reg1D* and *hvk1hvk2D* are glucose-repression mutants that share in common the fact that the Snf1 protein kinase complex is abnormally active in cells growing in glucose [5, 10], we checked the expression of *HXT1* in double *reg1Dsnf1D* and triple *hvk1hvk2D snf1D* mutants and observed a recovery in the induction of *HXT1* expression by glucose ([Table 2](#)). Therefore, the inhibition of *HXT1* expression observed in *hvk1hvk2D* and *reg1D* mutants was mainly due to the presence of an abnormally active Snf1 protein kinase.

Table 2 The activation of Snf1 inhibits *HXT1* expression

Cells containing the centromeric plasmid *pC-HXT1-lacZ* [31] and growing exponentially in 4% glucose were harvested. Invertase and **b**-galactosidase activities were measured as described in the Materials and methods section. Values for invertase are means from three different transformants (S.D. <10% in all cases) and values for **b**-galactosidase are means from four–six transformants (S.D. <15% in all cases).

	b-Galactosidase (Miller units)	Invertase (units)
Wild-type FY250	88	<1
<i>hvk1</i>	87	<1
<i>hvk2</i>	33	25
<i>hvk1 hvk2</i>	3	275
<i>hvk1hvk2snf1</i>	29	<1
<i>reg1</i>	2	126
<i>reg1 snf1</i>	82	<1
<i>snf1</i>	86	<1

Since in wild-type cells the expression of *HXT1* is also inhibited when the cells are growing in low glucose ([12]; see also [Table 7](#), below), conditions in which Snf1 protein kinase is active, we suggest that the activation of Snf1, either by physiological conditions (growth in low-glucose conditions) or by eliminating negative regulators such as Hvk2 or Reg1, would lead to an inhibition of *HXT1* expression. This would define an additional

function of Snf1 in transcriptional regulation, where so far only the activation of target genes has been well documented, i.e. by inhibiting repressors as Mig1, by activating activators as Cat8 or Sip4 [1] or by activating directly the transcription machinery [33, 34]. Therefore, Snf1 would not only activate the expression of genes involved in the assimilation of alternative carbon sources, but it would also repress the expression of genes induced by glucose. In this way Snf1 would mimic the effect of its mammalian homologue AMP-activated protein kinase in transcriptional regulation. In mammalian hepatocytes it has been described that active AMP- activated protein kinase inhibits the expression of glucose-induced genes such as those encoding L-pyruvate kinase (L-PK), fatty acid synthase (FAS), acetyl-CoA carboxylase (ACC), spot 14 (S14) and pre-proinsulin (PPI) [35–38].

2.- Std1 interacts with Snf1

To analyse the mechanism of action of Snf1 kinase on the regulation of *HXT1* expression, we looked for possible interactions between Snf1 and some of the components of the *HXT1* glucose-induction pathway (see Introduction). A clear candidate was Std1 (Msn3), a negative regulator of *HXT1* expression [12], since it was originally isolated as a multicopy suppressor of *snf4* deficiency (Snf4 being the activator subunit of the Snf1 protein kinase complex) [39]. It has also been described previously that the increase in gene dosage of Std1 led to an activation of the Snf1 complex, and the same authors demonstrated that Std1 interacted physically with Snf1, both by two-hybrid and co-immunoprecipitation analysis [39]. We studied further the interaction between Std1 and Snf1 and found that it was only observed when Snf1 was in its active state (cells growing in low-glucose conditions; Table 3). A mutation that inhibited Snf1 activity (T210A) [5] eliminated the interaction with Std1, confirming that Std1 only interacted with Snf1 when the kinase

was in its active conformation. [Table 3](#) also shows that Std1 interacted with the catalytic domain of Snf1 (Snf1KD) and not with its regulatory domain (Snf1RD). We also checked for possible two-hybrid interactions between Std1 and any of the Snf1 kinase regulators such as Snf4, Hxk2 or Reg1, but we did not observe any, in either high- or low-glucose conditions (results not shown).

Table 3 Two-hybrid interaction between Std1 and Snf1

CTY10.5d cells expressing the corresponding LexA-Snf1 fusion proteins and Gal4-activating domain (GAD)-Std1 were grown to mid-logarithmic phase in selective SC/4% glucose medium; cells were then washed with water and shifted to SC/0.05% glucose medium for 3 h. Values are mean β -galactosidase activities from four–six transformants (S.D.<15% in all cases). Western blotting indicated that levels of interacting proteins were similar in all cases (results not shown).

LexA fusion	GAD fusion	b-Galactosidase activity (Miller units)	
		4%Glucose	Shift to 0.05% glucose
LexA-Snf1	GAD-Std1	0.8	4.0
LexA-Snf1	GAD	0.3	0.3
LexA	GAD-Std1	0.3	0.5
LexA-Snf1T210A	GAD-Std1	0.4	0.5
LexA-Snf1KD	GAD-Std1	6.4	5.3
LexA-Snf1RD	GAD-Std1	0.4	0.4

Table 4 Overexpression of Std1 inhibits *HXT1* expression through an active Snf1

FY250 snf1D cells were transformed with the centromeric pC-*HXT1-lacZ* plasmid, with the plasmids pWS-Snf1, pWS-Snf1K84R (kinase-dead form) and pWS-Snf1T210A (inactive Snf1) and also with the indicated plasmids. *b*-Galactosidase activities were measured in triple transformants growing exponentially in 4% glucose minimal medium. Values are means from four–six different transformants (S.D. <15% in all cases). Invertase was also measured in the same cells (S.D. <10% in all cases). Western blotting indicated that the levels of HA-Std1 were similar in the corresponding transformants (results not shown).

Plasmid	pWS-Snf1		pWS-Snf1K84R		pWS-Snf1T210A	
	Invertase (units)	pHXT1-lacZ <i>b</i> -galactosidase (units)	Invertase (units)	pHXT1-lacZ <i>b</i> -galactosidase (units)	Invertase (units)	pHXT1-lacZ <i>b</i> -galactosidase (units)
pSK93 (empty)	1	45	1	43	1	44
pSKStd1	11	6	1	40	1	43

We also studied the effects of the increase in gene dosage of Std1 on Snf1 complex activity. [Table 4](#) shows that this increase caused a relief in *SUC2* glucose repression, as already described [[39](#)]. It also caused a dramatic

decrease in *HXT1* induction (Table 4). The effects of Std1 on both *SUC2* and *HXT1* expression were dependent on the presence of an active Snf1 kinase. In the presence of inactive forms of Snf1, such as a kinase- dead Snf1K84R mutant or a form that can not be activated (Snf1T210A mutant), no effect on the expression of these genes was observed. These results were in agreement with previous observations [18].

In conclusion, the action of Std1 on *SUC2* and *HXT1* expression was mediated via the activation of Snf1, since in the absence of an active form of the kinase Std1 was unable to affect gene expression.

3.- Std1 interacts with Rgt1

Since it has been described that Std1 could modulate negatively the expression of *HXT1* in low-glucose conditions (*std1* mutants show an increased expression of *HXT1* in low glucose [18]) and since Rgt1 is the major transcription factor involved in *HXT1* expression (see [12] for a review), we studied the possible interaction between Std1 and Rgt1. By two-hybrid analysis we observed a positive interaction between these two proteins (Table 5). This interaction did not improve when the cells were shifted from high- to low-glucose conditions, perhaps because the increase in gene dosage of Std1 had already activated the Snf1 kinase in cells growing in glucose, as demonstrated by the high levels of invertase detected in the same cells (Table 5). The physical interaction between Std1 and Rgt1 was confirmed by pull-down assays in cells expressing GST-Std1 and HA-Rgt1 as fusion proteins. Figure 1 shows that there was a specific interaction between Std1 and Rgt1.

Table 5 Two-hybrid interaction between Std1 and Rgt1

*CTY10.5d cells expressing LexA-Std1 and Gal4-activating domain (GAD)-Rgt1 fusion proteins were grown to mid-logarithmic phase in selective SC/4% glucose medium; cells were then washed with water and shifted to SC/0.05% glucose medium for 3 h. Values are mean **b**-galactosidase activities from four–six transformants (S.D.<15% in all cases). Invertase was also measured in cells growing in 4% glucose medium (S.D. <10% in all cases).*

LexA fusion	GAD fusion	b-Galactosidase (Miller units)		Invertase (units)
		4% Glucose	Shift to 0.05% glucose	
LexA-Std1	GAD-Rgt1	48	45	60
LexA-Std1	GAD	<1	<1	60
LexA	GAD-Rgt1	<1	<1	<1

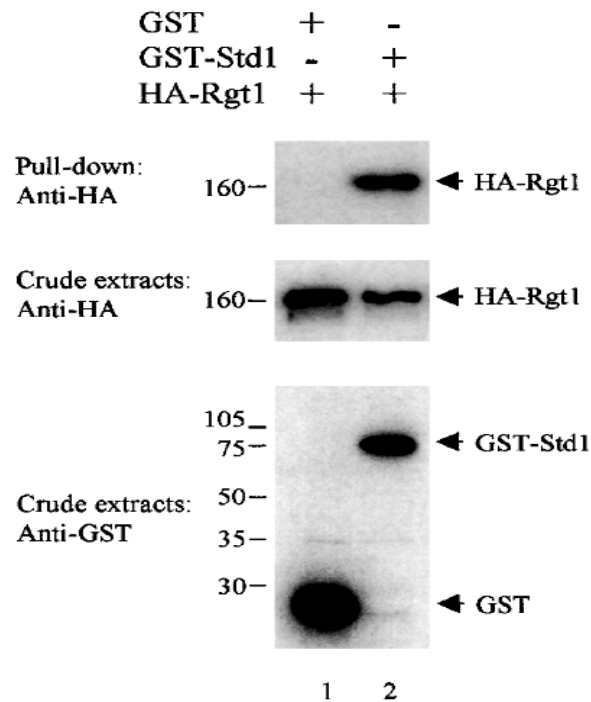


Figure 1 Pull down assays between GST-Std1 and HA-Rgt1

Crude extracts (250 μ g) were prepared from FY250 cells growing in glucose expressing GST-Std1 (plasmid pGST-Std1) and HA-Rgt1 (plasmid pSK-Rgt1) or containing the corresponding empty vectors. GST-Std1 fusion proteins were pulled down with GSH-agarose. Proteins in the pellet were analyzed by SDS-PAGE and immunodetected with anti-HA monoclonal antibodies (upper panel). Proteins in the crude extracts (5 μ g) were also immunodetected with either anti-HA (middle panel) or anti-GST (lower panel) antisera. Size standards are indicated in kDa.

We also assayed the two-hybrid interaction between Rgt1 and Snf1 or any of its regulators (Snf4, Hxk2 and Reg1) but we were not able to detect any interaction in either high- or low-glucose conditions (results not shown).

Table 6 Overexpression of Rgt1 does not modify *HXT1* expression

*FY250 cells were transformed with the centromeric pC-HXT1-lacZ plasmid and with the indicated plasmids. **β**-Galactosidase activities were measured in triple transformants growing exponentially in 4% glucose minimal medium. Values are means from four–six different transformants (S.D. <15% in all cases). Invertase was also measured in the same cells (S.D. <10% in all cases). Western blotting indicated that the corresponding transformants contained similar amounts of HA-Std1 and HA-Rgt1, respectively (results not shown).*

		Invertase (units)	pHXT1-lacZ β-galactosidase (Miller units)
pSK93 (empty)	pWS93 (empty)	<1	65
pSK-Std1	pWS93 (empty)	16	6
pSK93 (empty)	pWS-Rgt1	<1	71
pSK-Std1	pWS-Rgt1	14	60

Since the increase in gene dosage of Std1 (by activation of Snf1 kinase) caused an inhibition of *HXT1* expression (see [Table 4](#)), we checked whether an increase in the gene dosage of Rgt1 could counteract the effects of Std1. As shown in [Table 6](#), an increase in gene dosage of Rgt1 alone did not modify *HXT1* induction or *SUC2* repression by glucose. The combined increase in gene dosage of Rgt1 and Std1 did not show any inhibition of *HXT1* expression, either, indicating that the excess of Rgt1 could overcome the inhibitory effect of activated Snf1 kinase and still activate *HXT1* expression. This effect was specific on the induction of *HXT1* since the expression of *SUC2* was still relieved from glucose repression in these transformants, as an indication of the active state of the Snf1 kinase ([Table 6](#)).

4.- Std1 is dispensable for the inhibitory effect of active Snf1 protein kinase on *HXT1* expression

The results presented so far indicate that under conditions in which Snf1 kinase was active, Std1 interacted with Snf1 ([Table 3](#)) and also with Rgt1 ([Table 5](#) and [Figure 1](#)), suggesting that perhaps Std1 could act in recruiting Snf1 to Rgt1. To test this hypothesis, we analysed the expression of *HXT1* in mutant cells lacking Std1. To avoid possible interference from other components of the *HXT1* glucose-induction pathway, we used mutants lacking, in addition, Mth1 (a Std1 homologue [[12](#)]) and the two membrane glucose sensors, Snf3 and Rgt2 [[12](#)]. This quadruple mutant *rgt2D snf3D mth1D std1D* showed constitutive expression of *HXT1* in either high- or low-glucose conditions ([Table 7](#)), in agreement with previous results [[18](#)]. However, the additional deletion of *HXK1* and *HXK2* (sextuple *rgt2D snf3D mth1D std1D hxk1D hxk2D* mutant) caused constitutive activation of Snf1 kinase (measured as the presence of high levels of invertase) and prevented *HXT1* expression in both high- and low-glucose conditions ([Table 7](#)). These results indicated that activated Snf1 kinase was able to affect *HXT1* expression in the absence of Std1 and Mth1, suggesting that Std1 was mainly involved in the activation of Snf1 in wild-type cells and that if Snf1 kinase were activated by alternative mechanisms, the action of Std1 would be dispensable. The low levels of invertase detected in the quadruple mutant (*rgt2D snf3D mth1D std1D*) growing in low-glucose conditions would indicate that Snf1 kinase was not properly activated in these cells, and perhaps this was the reason why *HXT1* expression remained high under these conditions ([Table 7](#)). Recent data indicate that in double *std1D mth1D* mutants, Snf1 kinase was not properly activated in low- glucose conditions either [[18](#)], suggesting again a possible involvement of Std1 and Mth1 in the activation of Snf1 kinase.

Table 7 Expression of *HXT1* and *SUC2* in different mutants and growth conditions

Cells containing the multicopy *pHXT1-lacZ* plasmid [20] and growing exponentially in 4% glucose or 2% raffinose plus 0.05% glucose were harvested. Invertase and **b**-galactosidase activities were measured as described in the Materials and methods section. Invertase values are means from three different transformants (S.D. <10% in all cases). Values for **b**-galactosidase are means from four–six transformants (S.D. <15% in all cases).

Strain	pHXT1-lacZ b-galactosidase (miller units)		SUC2 invertase (units)	
	4% Glucose	2% Raffinose	4% Glucose	2% Raffinose
	Wild-type W303-1A	266	8	<1
<i>rgt2 snf3 mth1 std1</i>	196	105	<1	3
<i>rgt2 snf3 mth1 std1 hxx1 hxx2</i>	8	7	42	40

One possibility to explain the inhibitory effect of Snf1 activation on *HXT1* expression could be that the kinase promoted the destruction of Rgt1 or changed the subcellular localization of the transcription factor, as in the case of Mig1 [40]. We ruled out the first possibility when we observed similar levels of functional HA-Rgt1 in wild-type and in *snf1* and *reg1* (where Snf1 is constitutively activated) mutants growing in glucose (results not shown). To check the second hypothesis, we constructed a functional Rgt1–GFP fusion

protein (see the Materials and methods section) and studied the subcellular localization of the protein in different mutants and growth conditions. We observed that Rgt1–GFP fusion protein was always located inside the nucleus in either high- or low-glucose conditions, in either wild-type cells ([Figure 2](#)) or in *snf1D* or *reg1D* mutants (results not shown). Therefore, Snf1 activation did not modify the subcellular localization of Rgt1.

Alternatively, Snf1 could modify Rgt1 either directly or indirectly, and this could change its transcriptional properties, switching it from an activator to a repressor of *HXT1* expression. In agreement with this hypothesis, the increase in gene dosage of Rgt1 in cells having an activated Snf1 kinase ([Table 6](#)) caused regular *HXT1* induction while still having derepressed *SUC2* expression, perhaps because an excess of Rgt1 could escape Snf1 modification. To check for possible Snf1- dependent modifications of Rgt1, we analysed the electrophoretic mobility of a HA-Rgt1 fusion protein in wild-type and *snf1D* cells but we were unable to detect any differences in either cells growing in glucose or shifted to low-glucose conditions for 3h (results not shown). As Rgt1 is a large protein (128kDa, although it runs abnormally in SDS/PAGE as a protein of around 160kDa), very rich in serine (13.2%) and threonine (7.1%) residues, which is phosphorylated in more than 30 residues [[41](#)], a more detailed analysis is required to understand the putative Snf1-dependent modifications.

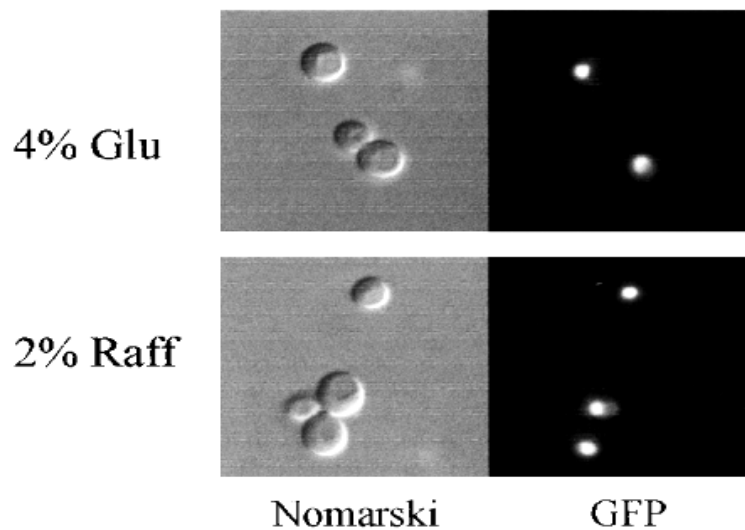


Figure 2 Subcellular localization of Rgt1-GFP

*Wild type cells expressing Rgt1-GFP were grown in 4% glucose or 2% raffinose plus 0.05% glucose at 30°C until they reached the exponential phase. Aliquots were then taken and analyzed as described in Materials and Methods. In each case, a picture of the GFP-fluorescence and the Nomarski optics was taken. Similar results were observed with *snf1* and *reg1* mutants expressing the same fusion protein (data not shown).*

5.- Rgt1 interacts with Ssn6

It has been genetically defined that Ssn6, a general repressor of transcription in yeast [42, 43], plays a major role in repressing *HXT1* expression; in *ssn6* mutants the expression of *HXT1* is not severely affected by the depletion of glucose [17]. It was proposed that, in low-glucose conditions, Rgt1 recruited Ssn6 to perform its repressing activity [17]. We confirmed this hypothesis by pull-down assays in cells expressing functional GST-Ssn6 and HA-Rgt1 as fusion proteins. Figure 3 shows that there was a specific interaction between Ssn6 and Rgt1.

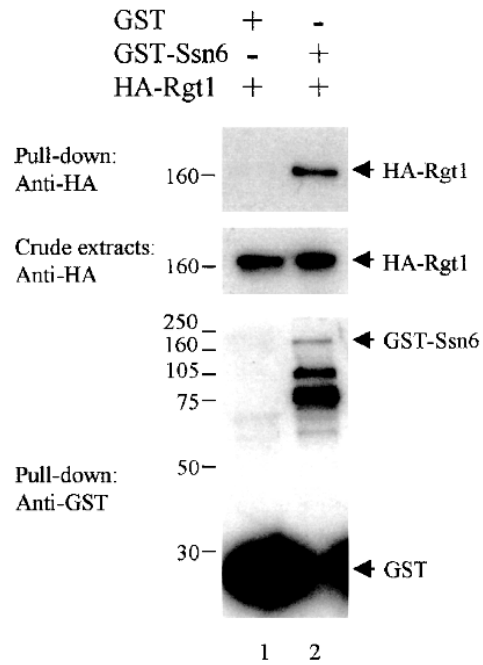


Figure 3 Pull-down assays between GST-Ssn6 and HA-Rgt1

Crude extracts (500 μ g) were prepared from FY250 cells growing in glucose expressing functional GST-Ssn6 (plasmid pGST-Ssn6) and HA-Rgt1 (plasmid pSK-Rgt1) or containing the corresponding empty vectors that had been shifted to 0.05% glucose-containing medium for 30 min. GST-Ssn6 fusion proteins were pulled down with GSH-agarose. Proteins in the pellet were analyzed by SDS-PAGE and immunodetected with anti-HA monoclonal antibodies (upper panel). Proteins in the crude extracts (5 μ g) were also immunodetected with either anti-HA (middle panel) or anti-GST polyclonal (lower panel) antibodies. Size standards are indicated in kDa.

Taking all these results together, we suggest the following model of regulation of *HXT1* expression (Figure 4). When glucose is abundant, a signal is assessed by the sensor protein Rgt2 and transmitted through the SCF–Grr1 ubiquitination complex to the Rgt1 transcription factor, activating *HXT1* expression. When the levels of glucose become depleted, Snf1 activation, caused probably by a conformational change in response to phosphorylation of its Thr-210 residue and interaction of the Snf4 activator subunit with the regulatory domain of Snf1 kinase, could modify, either directly or indirectly, Rgt1. This would allow its interaction with the Ssn6/Tup1 repressor complex that eventually would inhibit *HXT1* expression. Std1 would be involved in the activation of Snf1 in wild-type cells but if Snf1 kinase were activated by alternative mechanisms the action of Std1 would be dispensable

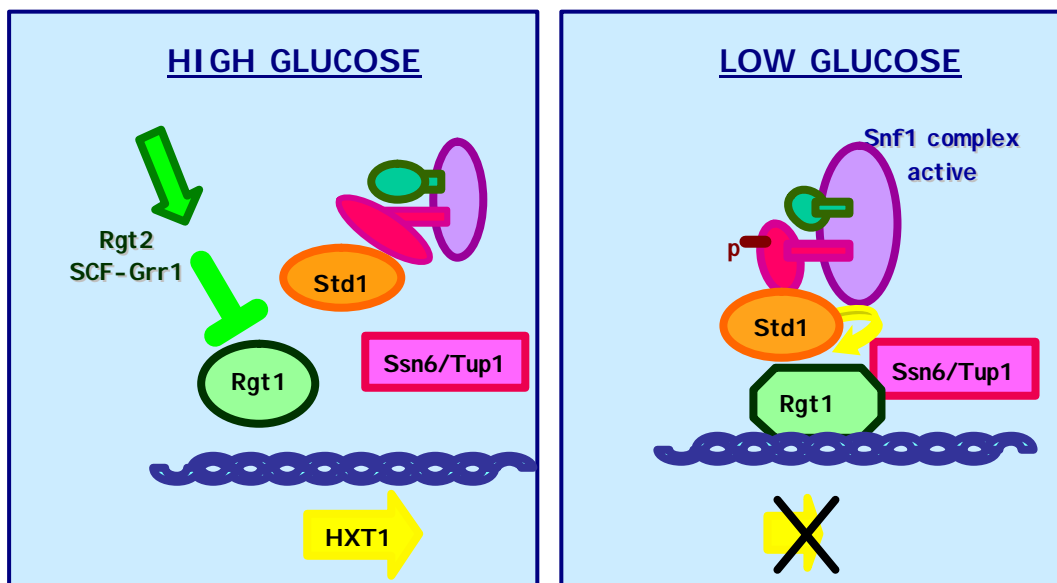


Figure 4 Model of regulation of *HXT1* expression by glucose

See text for details.

ACKNOWLEDGMENTS

We are very grateful to Dr Marian Carlson for strains, plasmids and critical reading of the manuscript. We also thank Dr F. Winston, Dr R. Sternglanz and Dr J.M. Gancedo for strains. This work was supported by Spanish Ministry of Education and Science grant PB98-0486. L.T-C. is supported by a Formación de Personal Investigador (FPI) fellowship from the Spanish Ministry of Science and Technology.

REFERENCES

1. Carlson, M. (1999). Glucose repression in yeast. *Curr. Opin. Microbiol.* 2, 202–207.
2. Gancedo, J.M. (1998). Yeast carbon catabolite repression. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62, 334–361.
3. Rolland, F., Winderickx, J. and Thevelein, J.M. (2001). Glucose-sensing mechanisms in eukaryotic cells. *Trends Biochem. Sci.* 26, 310–317.
4. Jiang, R. and Carlson, M. (1997) The Snf1 protein kinase and its activating subunit, Snf4, interact with distinct domains of the Sip1/Sip2/Gal83 component in the kinase complex. *Mol. Cell. Biol.* 17, 2099–2106.
5. Jiang, R. and Carlson, M. (1996). Glucose regulates protein interactions within the yeast SNF1 protein kinase complex. *Genes Dev.* 10, 3105–3115.
6. Alms, G.R., Sanz, P., Carlson, M. and Haystead, T.A. (1999). Reg1p targets protein phosphatase 1 to dephosphorylate hexokinase PII in *Saccharomyces cerevisiae*: characterizing the effects of a phosphatase subunit on the yeast proteome. *EMBO J.* 18, 4157–4168.

7. Dombek, K.M., Voronkova, V., Raney, A. and Young, E.T. (1999) Functional analysis of the yeast Glc7-binding protein Reg1 identifies a protein phosphatase type 1-binding motif as essential for repression of ADH2 expression. *Mol. Cell. Biol.* 19, 6029–6040.

8. Tu, J. and Carlson, M.(1995). REG1 binds to protein phosphatase type 1 and regulates glucose repression in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.* 14, 5939–5946.

9. Ludin, K., Jiang, R. and Carlson, M. (1998). Glucose-regulated interaction of a regulatory subunit of protein phosphatase 1 with the Snf1 protein kinase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95, 6245–6250.

10. Sanz, P., Alms, G.R., Haystead, T.A. and Carlson, M. (2000) Regulatory interactions between the Reg1-Glc7 protein phosphatase and the Snf1 protein kinase. *Mol. Cell. Biol.* 20, 1321–1328.

11. Johnston, M. (1999) Feasting, fasting and fermenting. *Trends Genet.* 15, 29–33.

12. Ozcan, S. and Johnston, M. (1999) Function and regulation of yeast hexose transporters. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 63, 554–569.

13. Ozcan, S., Dover, J., Rosenwald, A.G., Wolfl, S. and Johnston, M. (1996) Two glucose transporters in *Saccharomyces cerevisiae* are glucose sensors that generate a signal for induction of gene expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93, 12428–12432.

14. Ozcan, S., Dover, J. and Johnston, M. (1998) Glucose sensing and signaling by two glucose receptors in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.* 17, 2566–2573.

15. Li, F.N. and Johnston, M. (1997) Grr1 of *Saccharomyces cerevisiae* is connected to the ubiquitin proteolysis machinery through Skp1: coupling glucose sensing to gene expression and the cell cycle. *EMBO J.* 16, 5629–5638.

16. Kishi, T., Seno, T. and Yamao, F. (1998) Grr1 functions in the ubiquitin pathway in *Saccharomyces cerevisiae* through association with Skp1. *Mol. Gen. Genet.* 257, 143–148.

17. Ozcan, S., Leong, T. and Johnston, M. (1996) Rgt1p of *Saccharomyces cerevisiae*, a key regulator of glucose-induced genes, is both an activator and a repressor of transcription. *Mol. Cell. Biol.* 16, 6419–6426.

18. Schmidt, M.C., McCartney, R.R., Zhang, X., Tillman, T.S., Solimeo, H., Wolfl, S., Almonte, C. and Watkins, S.C. (1999) Std1 and Mth1 proteins interact with the glucose sensors to control glucose-regulated gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 19, 4561–4571.

19. Lafuente, M.J., Gancedo, C., Jauniaux, J.C. and Gancedo, J.M. (2000) Mth1 receives the signal given by the glucose sensors Snf3 and Rgt2 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Microbiol.* 35, 161–172.

20. Ozcan, S. and Johnston, M. (1995) Three different regulatory mechanisms enable yeast hexose transporter (*HXT*) genes to be induced by different levels of glucose. *Mol. Cell. Biol.* 15, 1564–1572.

21. Rothstein, R.J. (1983) One-step gene disruption in yeast. *Methods Enzymol.* 101C, 202–210.

22. Alani, E. and Kleckner, N. (1987) A new type of fusion analysis applicable to many organisms: protein fusions to the *URA3* gene of yeast. *Genetics* 117, 5–12.

23. Wach, A., Brachat, A., Pöhlmann, R. and Philippsen, P. (1994) New heterologous modules for classical or PCR-based gene disruptions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 10, 1793–1808.

24. Rose, M.D., Winston, F. and Hieter, P. (1990) *Methods in Yeast Genetics, a Laboratory Course Manual*, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY.

25. Legrain, P., Dokhelar, M.-C. and Transy, C. (1994) Detection of protein-protein interactions using different vectors in the two-hybrid system. *Nucleic Acids Res.* 22, 3241–3242.

26. Golemis, E.A., Serbriiskii, I., Gyuris, J. and Brent, R. (1997) Interaction Trap/two-hybrid system to identify interacting proteins. In *Current Protocols in Molecular Biology*, vol. 3 (Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A. and Struhl, K., eds.), pp. 20.1.1–20.1.35, John Wiley & Sons, New York.

27. Song, W. and Carlson, M. (1998) Srb/mediator proteins interact functionally and physically with transcriptional repressor Sfl1. *EMBO J.* 17, 5757–5765.

28. Kim, J. and Hirsch, J.P. (1998) A nucleolar protein that affects mating efficiency in *Saccharomyces cerevisiae* by altering the morphological response to pheromone. *Genetics* 149, 795–805.

29. Sikorski, R.S. and Hieter, P. (1989) A system of shuttle vectors and yeast host strains designed for efficient manipulation of DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 122, 19–27.

30. Treitel, M.A., Kuchin, S. and Carlson, M. (1998) Snf1 protein kinase regulates phosphorylation of the Mig1 repressor in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 18, 6273–6280.

31. Mayordomo, I. and Sanz, P. (2001) Human pancreatic glucokinase (GlkB) complements the glucose signalling defect of *Saccharomyces cerevisiae* hxc2 mutants. *Yeast* 18, 1309–1316.

32. Goldstein, A. and Lampen, J.O. (1975) Beta-D-fructofuranoside fructohydrolase from yeast. *Methods Enzymol.* 42, 504–511.

33. Kuchin, S., Treich, I. and Carlson, M. (2000) A regulatory shortcut between the Snf1 protein kinase and RNA polymerase II holoenzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97, 7916–7920.

34. Lo, W.S., Duggan, L., Emre, T.N.C., Belotserkovskya, R., Lane, W.S., Shiekhattar, R. and Berger, S.L. (2001) Snf1—a histone kinase that works in concert with the histone acetyltransferase Gcn5 to regulate transcription. *Science* 293, 1142–1146.

35. Leclerc, I., Kahn, A. and Doiron, B. (1998) The 5´-AMP-activated protein kinase inhibits the transcriptional stimulation by glucose in liver cells, acting through the glucose response complex. *FEBS Lett.* 431, 180–184.

36. Foretz, M., Carling, D., Guichard, C., Ferre, P. and Foufelle, F. (1998) AMP-activated protein kinase inhibits the glucose-activated expression of fatty acid synthase gene in rat hepatocytes. *J. Biol. Chem.* 273, 14767–14771.

37. Woods, A., Azzout-Marniche, D., Foretz, M., Stein, S.C., Lemarchand, P., Ferre, P., Foufelle, F. and Carling, D. (2000) Characterization of the role of AMP-activated protein kinase in the regulation of glucose-

activated gene expression using constitutively active and dominant negative forms of the kinase. *Mol. Cell. Biol.* 20, 6704–6711.

38. da Silva Xavier, G., Leclerc, I., Salt, I.P., Doiron, B., Hardie, D.G., Kahn, A. and Rutter, G.A. (2000) Role of AMP-activated protein kinase in the regulation by glucose of islet beta cell gene expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97, 4023–4028.

39. Hubbard, E.J., Jiang, R. and Carlson, M. (1994) Dosage-dependent modulation of glucose repression by MSN3 (STD1) in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 14, 1972–1978.

40. DeVit, M.J., Waddle, J.A. and Johnston, M. (1997) Regulated nuclear translocation of the Mig1 glucose repressor. *Mol. Biol. Cell* 8, 1603–1618.

41. Johnston, M., Brachet, V., Polish, J. and Kim, J.-H. (2001) Glucose sensing and signal transduction. *Yeast* 18, S25.

42. Cooper, J.P., Roth, S.Y. and Simpson, R.T. (1994) The global transcriptional regulators, SSN6 and TUP1, play distinct roles in the establishment of a repressive chromatin structure. *Genes Dev.* 8, 1400–1410.

43. Keleher, C.A., Redd, M.J., Schultz, J., Carlson, M. and Johnson, A.D. (1992) Ssn6-Tup1 is a general repressor of transcription in yeast. *Cell* 68, 709–719.

44. Thomas, B.J. and Rothstein, R. (1989) Elevated recombination rates in transcriptionally active DNA. *Cell* 56, 619–630.

CAPITULO II :

Expression of the *HXT1* low-affinity glucose transporter requires the coordinated activities of the HOG and glucose signalling pathways

Expression of the *HXT1* low-affinity glucose transporter requires the coordinated activities of the HOG and glucose signalling pathways

Lidia Tomás-Cobos^{1,3}, Laura Casadomé^{2,3}, Glòria Mas², Pascual Sanz^{1,4} and Francesc Posas²

Running title: HOG pathway regulates yeast *HXT1* expression.

¹ Instituto de Biomedicina de Valencia (CSIC), Jaime Roig 11, 46010-Valencia, Spain.

² Cell signaling Unit, Dept. Ciències Experimentals i de la Salut, Universitat Pompeu Fabra, 08003-Barcelona, Spain.

³ L. Tomás-Cobos and L. Casadomé contributed equally to this work

⁴ Corresponding author address:

Instituto de Biomedicina de Valencia (CSIC), Jaime Roig 11, 46010-Valencia, Spain.

Tel. 3496-3391760

Fax. 3496-3690800

e-mail: sanz@ibv.csic.es

ABSTRACT

Expression of the *HXT1* gene, which encodes a low-affinity glucose transporter in *Saccharomyces cerevisiae*, is regulated positively in response to glucose by the general glucose induction pathway, involving the Snf3/Rgt2 membrane glucose sensors, the SCF-Grr1 ubiquitination complex and the Rgt1 transcription factor. In this study we show that in addition to the glucose signalling pathway, regulation of *HXT1* expression also requires the HOG pathway. Deletion of components in the glucose signalling pathway or in the HOG pathway results in impaired *HXT1* expression. Genetic analyses showed that whereas the glucose signalling pathway regulates *HXT1* through modulation of the Rgt1 transcription factor, the HOG pathway modulates *HXT1* through regulation of the Sko1/Tup1-Ssn6 complex. Coordinated regulation of the two signalling pathways is required for expression of *HXT1* by glucose and in response to osmostress.

Key words: *HXT1* glucose transporter, HOG pathway, Glucose signalling, osmotic stress, Sko1, Tup1-Ssn6, Rgt1.

Abbreviations used: MAPK, mitogen-activated protein kinase; MNNG, *N*-methyl-*N*'-nitro-*N*-nitrosoguanidine; X-gal, 5-bromo-4 chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranoside; ChIP, chromatin immunoprecipitation.

INTRODUCTION

Yeast cells are able to adjust cellular metabolism, gene expression and growth in response to environmental stimuli. For example, the presence of glucose, the most preferable carbon source, is able to elicit a complex metabolic response based in two major levels: i) allosteric modification of different enzymes and ii) regulation of gene expression. Transcriptional regulation varies from inhibition of expression (glucose repression) to activation of transcription (glucose induction) [see (10), (11), (28), (36), for reviews]. Some of the genes induced in response to glucose encode for glycolytic enzymes, ribosomal proteins and glucose transporters. Expression of the low-affinity glucose transporter *HXT1* has been used for decades as a model to study the process of transcriptional activation by glucose (28). Genetic and biochemical studies have defined several components that are involved in the regulation of *HXT1* expression. Glucose availability in the surrounding media is assessed by the membrane glucose sensor proteins Snf3 and Rgt2. This signal is then transmitted to the SCF-Grr1 ubiquitination complex [(16), (21)], which finally modulates the activity of Rgt1, a transcription factor that belongs to the Cys6-Zinc cluster protein family, which acts as a transcriptional repressor in the absence of glucose [(26), (28)]. Additional components of the glucose induction pathway are Std1 and Mth1, two proteins that modulate negatively *HXT1* expression [(20), (28)]; recent studies indicate that Std1 and Mth1 may interact with the C-terminal tails of the glucose sensors Rgt2 and Snf3 and also with Rgt1 [(19), (38), (43)], and that the SCF-Grr1 complex is involved at least in the inactivation of Mth1, mediating in this way the glucose-induced dissociation of Rgt1 from *HXT1* promoter and its activation (9). Moreover, data from several laboratories suggest the existence of an additional uncharacterized

transcription factor, different from Rgt1, that regulates *HXT1* gene expression (26).

Exposure of yeast cells to increases in extracellular osmolarity results in the activation of the Hog1 MAP kinase pathway. Activation of the Hog1 MAPK induces diverse osmo-adaptive responses such as regulation of gene expression. Genome-wide transcriptional analyses showed that a great number of genes are regulated by osmotic stress in a *HOG1* dependent manner. Among these, there are genes that encode proteins implicated in carbohydrate metabolism, general stress protection, protein production and signal transduction [reviewed in (14)]. Several transcription factors have been reported to lay downstream of the MAPK, regulating different subsets of osmostress responsive genes by different mechanisms. The general stress response transcription factors Msn2/Msn4 and the transcriptional regulator Hot1 are important for the recruitment of the Hog1 MAPK to stress inducible promoters [(1), (2)]. On the other hand, modification of Smp1, a member of the MEF2 family of transcription factors, by Hog1 is important to modulate its transcriptional activity (7). Sko1, a member of the ATF-CREB family, inhibits transcription of several osmostress inducible genes through recruitment of the general co-repressor complex Tup1-Ssn6 [(12), (24), (34)]. Sko1 is phosphorylated by the Hog1 MAPK upon stress and this is crucial to switch Sko1-Tup1-Ssn6 from a repressor to an activator complex [(33), (35)].

In this work we show that regulation of *HXT1* expression is achieved by two independent transcription factors, Rgt1 and Sko1, controlled by the glucose induction and HOG signalling pathways, respectively. Thus, induction of *HXT1* gene expression in response to glucose and in response to osmotic stress (provided glucose was present) requires the coordinated activity of two independent signalling pathways that converge at the promoter level of *HXT1*.

MATERIALS AND METHODS

Strains and genetic methods

Saccharomyces cerevisiae strains used in this study are listed in Table I. *snf1D::KanMX4* mutated alleles were obtained by gene disruption using a *Bam*HI fragment from plasmid pUC-*snf1D::KanMX4* (43). *hog1D::TRP1* mutated alleles were obtained by gene disruption using plasmid pDGH16 (23). *rgt1D::URA3* alleles were obtained by gene disruption using plasmid pUC-*rgt1D::URA3* (see below). All mutants were confirmed by PCR analysis using specific oligonucleotides.

Standard methods for genetic analysis and transformation were used. Yeast cultures were grown in synthetic complete (SC) medium lacking appropriate supplements to maintain selection for plasmids, supplemented with different carbon sources.

Plasmids

Centromeric plasmid pC-HXT1-lacZ (LEU2) was described in (25). The *HXT1* expression cassette (*HXT1* promoter fused to *Escherichia coli lacZ* gene) was subcloned into plasmids pRS313(HIS3), pRS314(TRP1) and pRS316(URA3) (41). Plasmids pEG202-Rgt1 (LexA-Rgt1) and the corresponding empty vector pEG202 were described in (43). Plasmid pSH18-18 (6lexAop-lacZ) was described in (18). To perform promoter analysis, PCR generated DNA fragments containing several regions of the *HXT1* promoter up to the ATG were cloned into YIp358R (URA3) or YIp368R (LEU2) (27). To analyse internal promoter regions, different stretches from the 5' upstream region were amplified by PCR and inserted into the CYC1-lacZ reporter construct pJS205 (40).

Plasmid pUC-*rgt1D::URA3* was constructed in the following way. Plasmid pUC-Rgt1 (43) was digested with *Bgl*II and dephosphorylated with calf intestinal phosphatase. In this way we removed a central 2806 bp of

RGT1, leaving 444 bp and 335 bp at 5' and 3' ends respectively as flanking regions. A *Bam*HI fragment from plasmid YDp-U (4), containing the *URA3* selection marker was subcloned into the *Bgl*II sites of the former plasmid to give pUC-*rgt1D*::*URA3*, that was digested with *Bam*HI and *Sal*I to obtain a linear fragment that was used in the disruption experiments.

Enzyme assays

Cells growing exponentially in 2% raffinose plus 0.05% glucose were pulsed with either 0.4M NaCl (final conc.), 2% glucose (final conc.) or a combination of 0.4M NaCl and 2% glucose (final conc.). At times 0, and 60 min, aliquots were taken from the cultures and the β -galactosidase activity assayed in permeabilized cells and expressed in Miller Units as in (22). Values are means from three to four independent transformants (S.D. <15% in all cases). *TUP1* deficient strains flocculate and thus, β -galactosidase activity was assayed in yeast extracts as in (37) and expressed in Miller Units/mg protein.

Immunoblot analysis

Preparation of protein extracts was essentially performed as described (37). The extraction buffer was 50 mM TrisHCl (pH 7.5), 150 mM NaCl, 0.1% Triton X-100, 1 mM dithiothreitol, 10% glycerol, 1 mM EDTA, 5 mM sodium pyrophosphate, 50 mM NaF and contained 2 mM phenylmethylsulfonyl fluoride and complete protease inhibitor cocktail (Roche). Anti-phospho-p38 MAP kinase (Cell Signaling Technology) polyclonal antibodies were used to follow Hog1 phosphorylation.

Isolation of *HXT1-LacZ* reporter repressors

LC91 (*MATa ura3 leu2 trp1 his3 rgt1::KAN Ylp358R HXT1-URA3*) and LC99 (*MATa ura3 leu2 his3 rgt1::KAN Ylp368R-HXT1-LEU2*) were mutagenized with N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (MNNG) as described in (32). Briefly, cells were grown in YPD at 30°C to OD₆₀₀ of 0.3, washed in Tris-maleate buffer (pH 6.0), and resuspended in 1/5 of the original volume in the same washing buffer. Then, cells were incubated with a solution of 30 µg/ml of MNNG in 10 mM sodium acetate buffer (pH 5.0) for 60 min at 30°C. After washes with 1% sodium thiosulfate cells were grown in YPD, at 30°C for 4 hours. Mutagenized cells were plated on minimal medium plates containing X-gal (~1000 colonies/plate). After incubating at 30°C for 4 days, positive clones were isolated. Mutant cells were then classified into complementation groups. Three mutants that represented the larger complementation groups were transformed with a yeast YCp50-genomic library. Positive clones were selected by their ability to block *HXT1* expression. Plasmids that complemented the corresponding mutations were isolated and sequenced.

Chromatin Immunoprecipitation Assays

Chromatin Immunoprecipitation PCR assays were performed as described previously (2). In all ChIP experiments, yeast cultures were grown in raffinose to early log phase (OD₆₀₀ 0.6-1.0) before cells were exposed to 2% glucose or osmotic stress.

Table I. Strains used in this study.

Strain	Genotype	Reference
TM141 (wild type)	MATa <i>his3 leu2 trp1 ura3</i>	(7)
TM233	MATa <i>hog1D::TRP1</i> derivative of TM141	(7)
<i>snf1Dhog1D</i>	MATa <i>snf1D::KanMX hog1D::TRP1</i> of TM141	This study
TM260	MATa <i>pbs2D::LEU2</i> derivative of TM141	(31)
FP50	MATa <i>ste11D::HIS3 ssk2D::LEU2 ssk22D::LEU2 his3 leu2 ura3</i>	(31)
FP57	MATa <i>sho1D::TRP1 ste11D::HIS3</i> derivative of TM141	(31)
TM257	MAT a <i>ssk2D::LEU2 ssk22D::LEU2 leu2 trp1 ura3</i>	(31)
W303-1A (wild type)	MATa <i>ade2 his3 leu2 trp1 ura3 can1</i>	(42)
<i>snf1D</i>	MATa <i>snf1D::KanMX</i> derivative of W303	This study
<i>msn2Dmsn4D</i>	MATa <i>msn2D::HIS3 msn4D::TRP1</i> derivative of W303	(3)
<i>rgt1D</i>	MATa <i>rgt1D::KanMX</i> derivative of W303	This study
<i>rgt1Dhog1D</i>	MATa <i>rgt1D::KanMX hog1D::TRP1</i> derivative of W303	This study
<i>tup1D</i>	MATa <i>tup1D::KanMX</i> derivative of W303	(34)
<i>tup1Dhog1D</i>	MATa <i>tup1D::KanMX hog1D::TRP1</i> derivative of W303	This study
<i>sko1D</i>	MATa <i>sko1D::KanMX</i> derivative of W303	(34)
<i>sko1Dhog1D</i>	MATa <i>sko1D::KanMX hog1D::TRP1</i> derivative of W303.	This study

Table I continuation

Strain	Genotype	Reference
<i>sko1D</i> <i>rgt1D</i>	MATa <i>sko1D::KanMX rgt1D::URA3</i> derivative of W303	This study
MSY401 (wild type)	MATa <i>his3 leu2 trp1 ura3</i>	(38)
MSY441	MATa <i>snf3D::hisG rgt2D::HIS3</i> derivative of MSY401	(38)
MSY192	MATa <i>std1D::HIS3 mth1D2</i> derivative of MSY401	(38)
<i>std1D</i> <i>mth1D</i> <i>hog1D</i>	MATa <i>std1D::HIS3 mth1D2 hog1D::TRP1</i> derivative of MSY401	This study
ENY.WA-1A (wild type)	MATα <i>his3 leu2 trp1 ura3</i>	(39)
ENY.cat80-8b	MATα <i>grr1 (cat80-24)</i> derivative of ENY.WA-1A	(39)
LC99	MATα <i>ura3 leu2 his3 rgt1::KAN Ylp368R-HXT1 (LEU2)</i>	This study
LC91	MATa <i>ura3 leu2 trp1 his3 rgt1::KAN Ylp358R HXT1 (URA3)</i>	This study

RESULTS

1.- The HOG pathway regulates *HXT1* gene expression by glucose and osmostress

Expression of the *HXT1* low affinity glucose transporter is regulated by glucose availability, being inhibited when glucose levels are scarce and activated in the presence of the sugar (see Ref. [3](#) for review). As shown in [Fig. 1](#), cells growing exponentially in 2% raffinose showed very low levels of *HXT1* expression (measured as a transcriptional fusion of the *HXT1* promoter to the *lacZ* gene, encoding β -galactosidase enzyme; see "Experimental Procedures"). After a pulse of 2% glucose, expression of *HXT1* was induced, in agreement with what it has been reported previously (see Ref. [3](#) for review). However, *HXT1* induction rate was higher when cells were subjected simultaneously to 2% glucose plus 0.4 M NaCl ([Fig. 1](#)). Similar results were obtained when 1 M sorbitol was used instead of NaCl (data not shown). These results were in agreement with data from microarray analyses that indicated that *HXT1* expression was enhanced after treatment with 0.4 M NaCl ([33](#)), 1 M NaCl ([34](#)), or 1 M sorbitol ([35](#)) in the presence of glucose. It is worth noting that no induction of *HXT1* expression was observed if cells were subjected only to osmotic stress in the absence of glucose ([Fig. 1](#)).

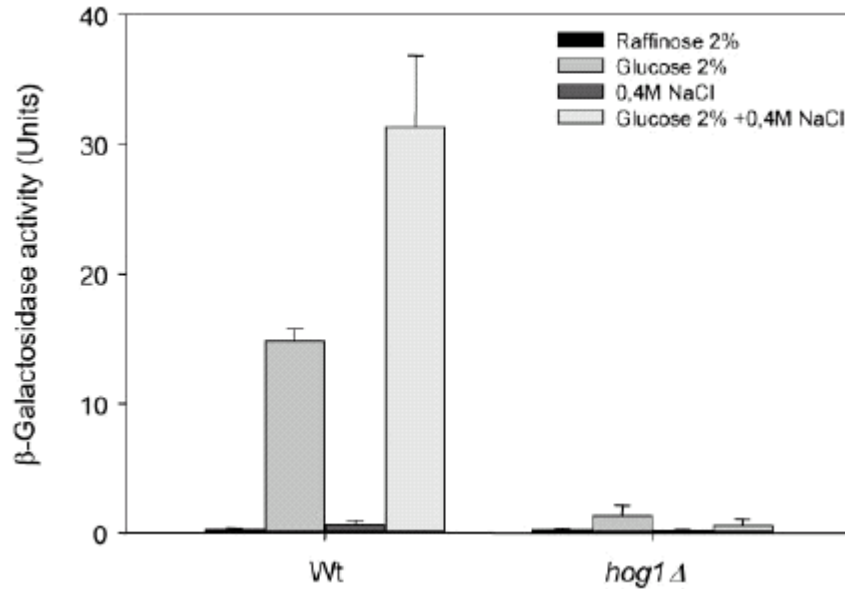


Figure 1. The Hog1 MAPK plays a major role in the induction of *HXT1* expression by glucose.

Wild type (TM141) and *hog1D* (TM233) cells were transformed with plasmid pC-*HXT1-lacZ*. Transformants were grown to mid-logarithmic phase in selective SC-2% raffinose plus 0.05% glucose medium. **b**-Galactosidase activity was assayed in cells 60 min after a pulse of either 2% glucose, 0.4 M NaCl, or 0.4 M NaCl plus 2% glucose. Values are mean **b**-galactosidase activities from four to six transformants (bars represent S.D.).

To determine if the HOG pathway was responsible for over-induction of *HXT1* expression in response to glucose plus osmotic stress, we analyzed *HXT1-lacZ* expression in a *hog1D* mutant strain ([Fig. 1](#)). To our surprise, *HXT1* expression was not induced even by glucose alone, indicating that the Hog1 protein kinase was required not only to overinduce *HXT1* expression by glucose plus osmostress but also to regulate *HXT1* expression by glucose. The absence of induction by glucose in a *hog1D* mutant was not due to a delay in the rate of induction, because when cells were grown overnight in 2% glucose, *hog1D* mutant cells still showed very reduced levels of *HXT1* expression in comparison to wild type cells (data not shown). A recovery in the induction of *HXT1* by glucose was obtained if *hog1D* mutants were transformed with a plasmid carrying a wild type Hog1 kinase, but not with a plasmid with a catalytically inactive form (Hog1KS-KN) (data not shown), indicating that the activity of the Hog1 kinase was necessary to allow induction of *HXT1* expression by glucose. In contrast to *HXT1*, expression of *HXT2*, encoding an intermediate-affinity glucose transporter that is repressed by glucose, was not affected in a *hog1D* strain (data not shown), indicating that the action of Hog1 was specific on *HXT1* expression.

Snf1 protein kinase activity affects negatively *HXT1* expression ([11](#)). To rule out the possibility that the absence of Hog1 kinase could stimulate the activity of the Snf1 kinase and then inhibit *HXT1* expression, we studied the activity of Snf1 protein kinase in a *hog1D* mutant by analyzing the regulation of the expression of *SUC2* (a glucose repressed gene) and found that it was similar to wild type ([Table II](#)). More importantly, induction of *HXT1* expression by glucose in a double *hog1D snf1D* mutant was similar to the *hog1D* mutant ([Table II](#)). These results indicated that the defect in the induction of *HXT1* by glucose in *hog1D* cells was not related to the activation of Snf1 protein kinase and that the Hog1 MAPK played a crucial role in the regulation of *HXT1* induction by glucose.

TABLE II: Snf1 protein kinase is not activated in a *hog1D* mutant.

Wild type (TM141), *snf1D*, *hog1D* and double *snf1D hog1D* mutant cells were transformed with plasmid pC-HXT1-lacZ. Transformants were grown to mid-logarithmic phase in selective SC-4% glucose medium; then, invertase and **b**-galactosidase activities were measured as described under "Experimental Procedures." Values for invertase are means from three different transformants (S.D. < 10% in all cases), and values for **b**-galactosidase are means from four to six transformants (S.D. <15% in all cases).

Strain	HXT1-lacZ b-Galactosidase (Units)	(SUC2) invertase
Wild type	100.4	<1
<i>snf1D</i>	114.8	<1
<i>hog1D</i>	10.4	<1
<i>snf1D hog1D</i>	13.2	<1

2.- Osmostress caused by extracellular glucose results in Hog1 activation and HXT1 gene expression

To analyze whether only the Hog1 MAPK or the integrity of the HOG pathway was needed for the induction of *HXT1* by glucose, we followed *HXT1* expression in mutants on several components of the HOG pathway. As shown in [Fig. 2A](#), deletion of the *PBS2* MAPK kinase or simultaneous deletion of the three MAPK kinase kinases of the HOG pathway, *STE11*, *SSK2*, and *SSK22*, abolished induction of *HXT1* by glucose. Thus, the integrity of the main core of the HOG pathway is required for *HXT1* induction by glucose.

Two upstream sensing mechanisms activate the core of the HOG pathway, the Sln1 "two-component" osmosensor and a second mechanism that involves the Sho1 transmembrane protein (36). Mutations in the Sho1 branch (double *sho1D ste11D* mutant) did not alter *HXT1* expression (Fig. 2A). However, mutants in the Sln1 branch of the HOG pathway (*ssk2D ssk22D* or *ssk1D* (data not shown)) showed a clear defect in the induction of *HXT1* by glucose (Fig. 2A). It is worth noting that, on the later strains, induction of *HXT1* was similar to wild type only when both glucose and NaCl were added (Fig. 2A). These results indicate that induction of *HXT1* expression by glucose is mediated by the Sln1 branch of the HOG pathway.

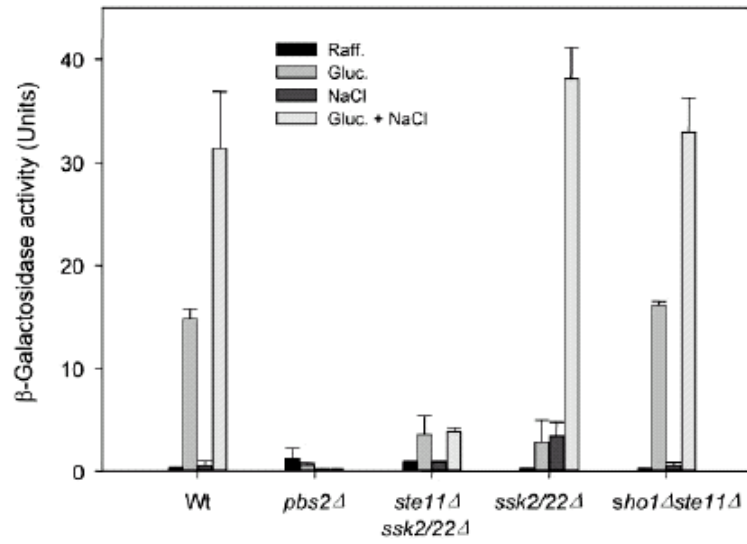
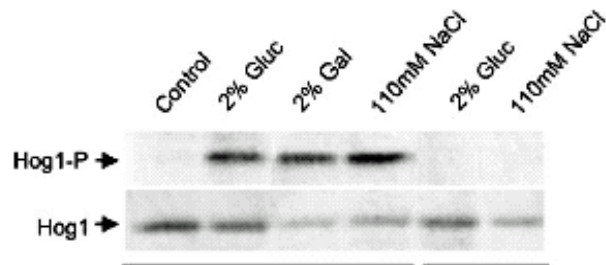
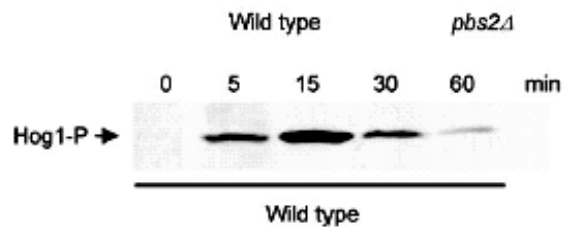
Activation of the Hog1 MAPK by phosphorylation has been described to occur in response to osmotic stress (see the introduction). To test whether glucose "per se" or the osmotic stress caused by the addition of 2% glucose to the medium was responsible for Hog1 activation, we followed Hog1 phosphorylation in response to the addition of sugar. As shown in Fig. 2B, addition of 2% (110 mM) glucose or 2% galactose to raffinose growing cells induced Hog1 phosphorylation to the same extent as treatment with 110 mM NaCl. Moreover, addition of higher concentrations of glucose or galactose led to higher levels of Hog1 phosphorylation (data not shown). As expected, phosphorylation of Hog1 by sugar occurred in wild type cells but not in *pbs2D* cells (Fig. 2B). Time course experiments showed that phosphorylation of Hog1 by glucose was transient (Fig. 2C), as it has been described for NaCl (13). Thus, Hog1 activation is caused by an increase in extracellular osmolarity caused by the addition of sugar, not necessarily restricted to glucose.

Because the presence of glucose was always necessary to stimulate *HXT1* expression and because in the absence of an active HOG pathway no induction of *HXT1* was observed (Figure 1 and 2), we suggest the possibility that the addition of 2% glucose to raffinose growing cells would elicit two different signals, one that would be transmitted through the glucose induction

pathway (see below) and another, where glucose would act as an osmolite that would activate the Sln1 branch of the HOG pathway, more sensitive to osmotic changes in the environment (13).

Figure 2. Activation of the Hog1 MAPK by glucose involves the Sln1 osmosensor.

A, induction of *HXT1* gene expression by glucose requires the Sln1 branch of the HOG pathway. Wild type (TM141) and several mutants of the HOG pathway, *pbs2* **Δ** (TM260), *ste11* **D** *ssk2* **D** *ssk22* **D** (FP50), *ssk2* **D** *ssk22* **D** (TM257), and *sho1* **D** *ste11* **D** (FP57), containing appropriated centromeric *pHXT1-lacZ* plasmids, were grown to mid-logarithmic phase in selective SC-2% raffinose plus 0.05% glucose medium. **b**-Galactosidase activity was assayed in cells 60 min after a pulse of either 2% glucose or 0.4 M NaCl plus 2% glucose. **B**, high sugar concentration results in activation of the Hog1 MAPK. Wild type (TM141) or *pbs2* **D** (TM260) cells were grown as in A and subjected to 2% glucose (Gluc), 2% galactose (Gal), or 110 mM NaCl. After 10 min, Hog1 phosphorylation (Hog1-P) was detected by immunoblot analysis using antibodies anti-phospho-p38 MAPK; anti-Hog1 was used as loading control. **C**, transient phosphorylation of Hog1 by external glucose. Wild type (TM141) cells, grown as in B, were subjected to 2% glucose for the indicated period of time and phosphorylated Hog1 (Hog1-P) was detected by immunoblot analysis.

A**B****C**

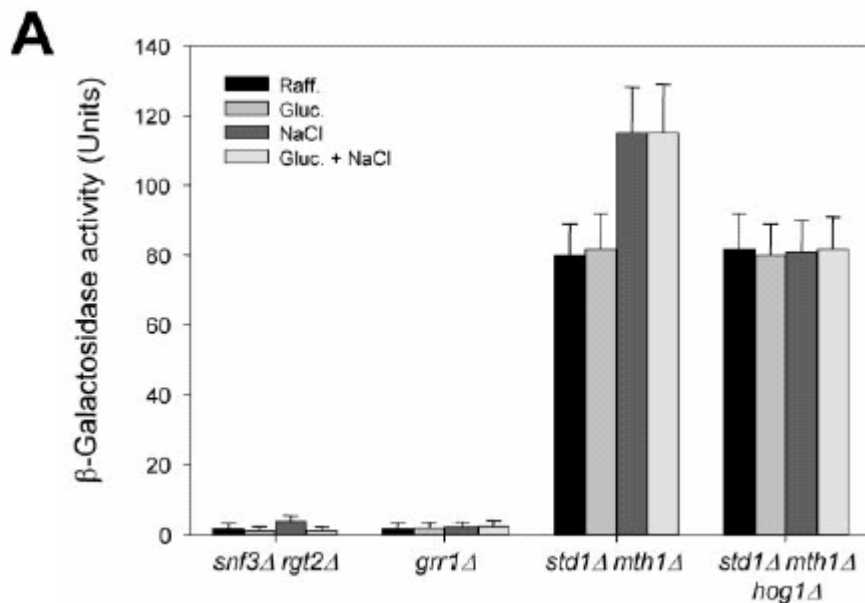
3.- Induction of *HXT1* expression upon glucose plus osmotic stress depends on the integrity of the glucose signalling pathway.

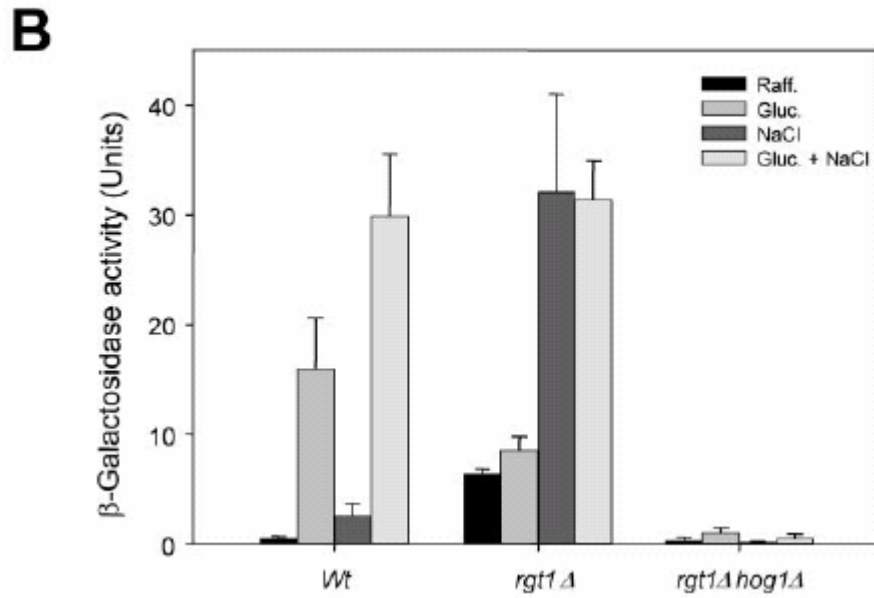
Induction of *HXT1* by glucose depends on the glucose signaling pathway (3). Then, we wanted to test whether integrity of the glucose signaling pathway was required to allow overinduction *HXT1* in response to glucose plus osmostress. Inactivation of the membrane glucose sensors Snf3 and Rgt2, and the SCF-Grr1 ubiquitination complex abolished *HXT1* expression by both glucose and osmostress (Fig. 3A). In contrast, deletion of the *MTH1* and *STD1* genes, known regulators of Rgt1 transcriptional repressor (8), resulted in constitutive expression of *HXT1*. However, in the double *std1D mth1D* mutant, osmostress but not glucose, was able to induce *HXT1* expression at even higher levels in a Hog1-dependent manner (Fig. 3A). Thus, integrity of the main core of the glucose signaling pathway (Snf3/Rgt2 and SCF-Grr1) is essential to allow over-induction of *HXT1* in response to glucose plus osmostress. If repressing properties of Rgt1 are avoided (*std1D mth1D* mutants), then the HOG pathway may overinduce *HXT1* expression in response to osmostress.

Deletion of *RGT1* repressor resulted in a mild deregulation of *HXT1* expression in absence of glucose and no further induction by glucose (Ref. 3 and Fig. 3B). In contrast, a clear induction of *HXT1* expression was observed by NaCl alone or by glucose plus NaCl (Fig. 3B). These effects were dependent on the presence of Hog1 kinase, because in the double *rgt1Δ hog1Δ* mutant no induction of *HXT1* was observed under any condition (Fig. 3B). Thus, in the absence of the Rgt1 transcriptional repressor, activation of the HOG pathway by osmostress leads to full *HXT1* induction, even in the absence of glucose.

Figure 3. Regulation of *HXT1* expression by glucose and osmostress depends on the glucose signaling pathway.

A, integrity of the glucose signaling pathway is required for *HXT1* expression. Yeast mutants *snf3Δ rgt2Δ* (MSY441), *grr1Δ* (ENY.cat80 -8b), *std1Δ mth1Δ* (MSY192), and *std1Δ mth1Δ hog1Δ*, were transformed with appropriated centromeric *pHXT1-lacZ* plasmids. Transformants were grown to mid-logarithmic phase in selective SC-2% raffinose plus 0.05% glucose medium. **b** -Galactosidase activity was assayed in cells 60 min after a pulse of either 2% glucose, 0.4 M NaCl, or 0.4 M NaCl plus 2% glucose. Values are mean **b**-galactosidase activities from four to six transformants (bars represent S.D.). The corresponding wild types MSY401 and ENY.WA-1A showed similar values of *HXT1* expression to TM141 in all the conditions (data not shown). **B**, the *Rgt1* transcriptional repressor blocks induction of *HXT1* by osmostress in the absence of glucose. Wild type (W303-1A), *rgt1Δ*, and *rgt1Δ hog1Δ* cells containing appropriated centromeric *pHXT1-lacZ* plasmids were grown and treated as in A.





An alternative explanation for the results presented so far was that the function of Rgt1 could be regulated directly by the Hog1 kinase. However, this was unlikely, because when we tested the transcriptional properties of a LexA-Rgt1 fusion, these were similar in both wild type and *hog1D* mutant (Table III).

TABLE III. - Transactivating properties of Rgt1 are not affected in a *hog1D* mutant.

Wild type (TM141) and hog1D (TM233) cells were transformed with plasmid pSH18-18 (containing 6lexAop-lacZ) and either plasmid pEG202 (LexA) or pEG202-Rgt1 (LexA-Rgt1). Transformants were grown to mid-logarithmic phase in selective SC-4% glucose medium. Values are mean β -galactosidase activities from four to six transformants (S.D. < 15% in all cases).

	6lexAop-lacZ β-Galactosidase (Units)	
	LexA	LexA-Rgt1
Wild type	<1	1940
<i>hog1D</i>	<1	2133

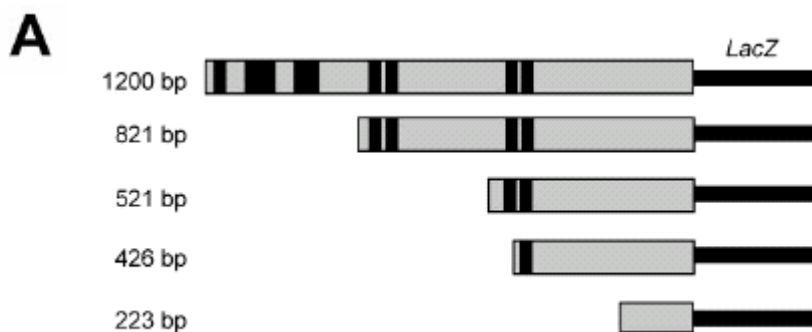
4.- Regulation of *HXT1* expression by the HOG and glucose signalling pathways is exerted at different sites on the *HXT1* promoter

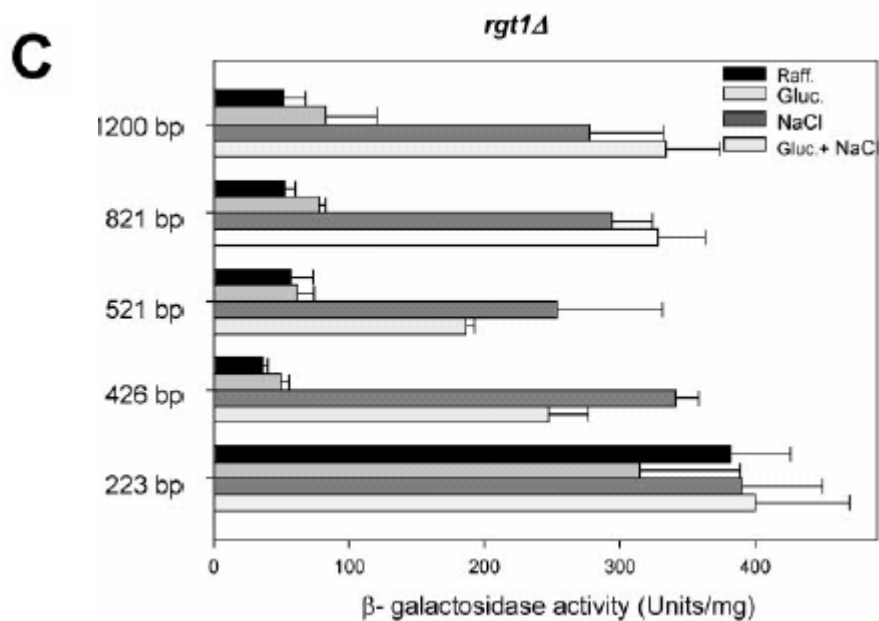
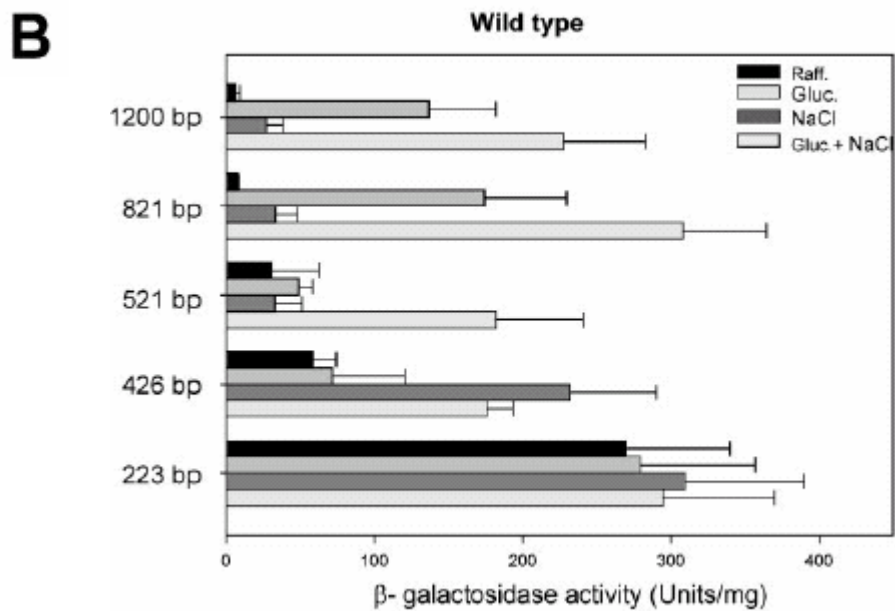
As shown above, induction of *HXT1* by glucose and osmostress requires the activation of two independent signaling pathways, glucose induction and HOG pathways. To identify sequences in the upstream control region of *HXT1* that are important for regulation by any of these pathways, we investigated the expression of a set of segments of the *HXT1* promoter fused to the *lacZ* gene, in cells growing in raffinose and then pulsed with glucose, NaCl, or glucose plus NaCl, as above (Fig. 4). Insertion of a fragment of \approx 200 bp (from -223 to ATG) to the YIp358R reporter vector gave high levels of β -galactosidase activity in any of the conditions tested, whereas

insertion of larger fragments (–1200 to ATG or –821 to ATG) resulted in strong repression under basal conditions (raffinose-growing cells) and strong induction in response to glucose or to glucose plus NaCl (Fig. 4B). These results indicated that regulation of *HXT1* expression consists mainly of a derepression process. Because we observed a similar derepression pattern when we assayed a fragment containing from –821 to ATG in comparison to full-length *HXT1* promoter (from –1200 to ATG), we suggest that the fragment comprised between –821 to –223 contained the main regulatory elements of *HXT1*.

Figure 4. Regulation of *HXT1* expression by glucose or osmstress is exerted at different sites on the *HXT1* promoter.

A. Schematic diagram of the *HXT1* promoter. Putative Rgt1 binding sites (spaced CGG pairs) are depicted in black. **B.** Segments from the *HXT1* up-stream region indicated on the left were inserted into Ylp358R or Ylp368R *lacZ* reporter plasmids (see "Experimental Procedures"). Constructs were introduced into wild type (W303–1A) (B) or *rgt1D* (C) cells, which were grown in raffinose and then pulsed with either 2% glucose, 0.4 M NaCl, or 0.4 M NaCl plus 2% glucose. **b**-Galactosidase activity (units/mg) was measured in cell extracts, 60 min after the pulses, and it is the result of the measurement in triplicate of three independent transformants (bars represent S.D.).





Further deletion analysis showed that a fragment containing from -521 to ATG was not induced by glucose, indicating that in the -821 to -521 region there must be sequences related to the induction of *HXT1* by glucose. We also

observed that this –521 to ATG fragment was not induced by NaCl alone, but it was fully induced by glucose plus NaCl (Fig. 4B). Interestingly, deletion of *RGT1* allowed full induction of this –521 to ATG fragment by NaCl in the absence of glucose (Fig. 4C), what indicated that Rgt1 was still able to block osmostress induction of this fragment in wild type cells. A fragment containing from –426 to ATG, which showed higher basal expression in raffinose and no glucose induction, suggesting a lack of Rgt1 repression, showed strong induction by NaCl in the absence of glucose in both wild type and *rgt1D* strains (Fig. 4, B and C). These results supported the idea that Rgt1 was blocking osmostress induction of *HXT1* by interacting with a promoter region located between –521 and –426 and that the HOG pathway affected another putative repressor that interacted with a promoter region located between –426 and –223.

5.- Sko1 transcription factor regulates *HXT1* expression under the control of the HOG pathway

As just mentioned, analysis of the *HXT1* promoter suggested the presence of an uncharacterized transcription factor regulated by HOG pathway that repressed *HXT1* expression. Inspection of the *HXT1* promoter did not yield any sequence known to be regulated by specific transcription factors other than stress response elements. STRE elements are known to be binding sites for Msn2 and Msn4 transcription factors (37). However, when we tested *HXT1* expression in yeast cells deficient in both *MSN2* and *MSN4* genes, we observed a similar pattern of *HXT1* expression, compared with the wild type strain (data not shown).

To identify the additional repressing factor that regulates *HXT1* expression, we conducted a mutant screening on the basis of the assumption

that simultaneous inactivation of *RGT1* and the unknown transcriptional repressor would render *HXT1* expression constitutively activated. Briefly, *rgt1D* cells growing on raffinose and containing an integrated *HXT1-lacZ* reporter construct were mutagenized with MNNG, and positive clones were selected by their ability to induce *HXT1* expression and, therefore, to produce β -galactosidase on X-gal-containing plates (described under "Experimental Procedures"). In this way, 30 positive clones were identified from ~55,000 colonies. Recessive mutants were selected and classified into a number of complementation groups. Three of the largest complementation groups were identified as *ssn6*, *tup1*, and *sko1* mutants by complementation cloning.

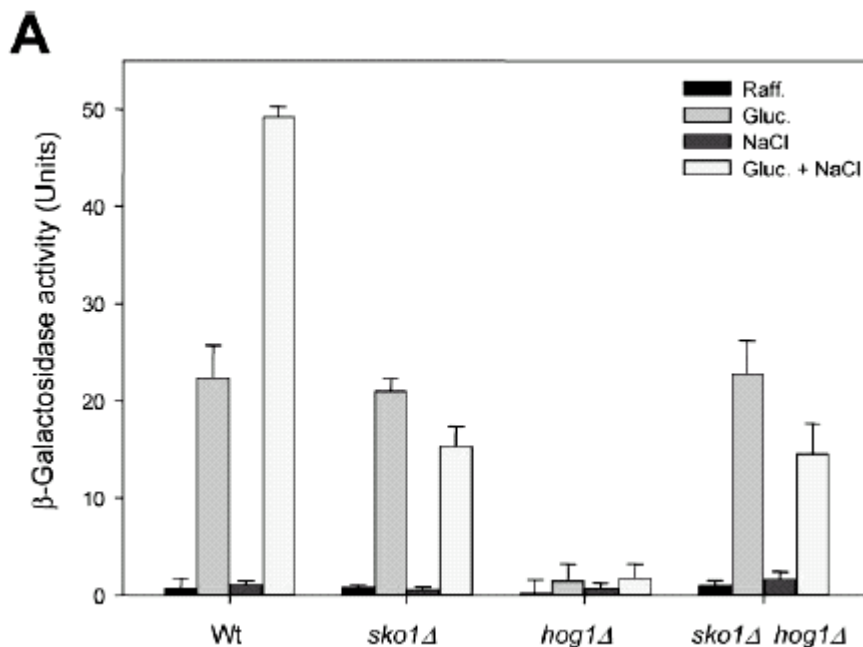
We then tested the effect of the deletion of *SKO1* in cells carrying the centromeric *HXT1-lacZ* reporter construct. As shown in [Fig. 5A](#), deletion of *SKO1* resulted in cells able to induce *HXT1* expression in response to glucose, but no further induction of *HXT1* expression was observed by the combined action of glucose plus osmostress. Moreover, a double *sko1D hog1D* mutant strain showed the same pattern of expression as the *sko1D* strain, indicating that the lack of expression of *HXT1* in a *hog1D* in response to glucose ([Fig. 1](#)) was caused by the inability of this strain to release Sko1 repression. Therefore, Sko1 mediates Hog1 regulation of *HXT1* expression.

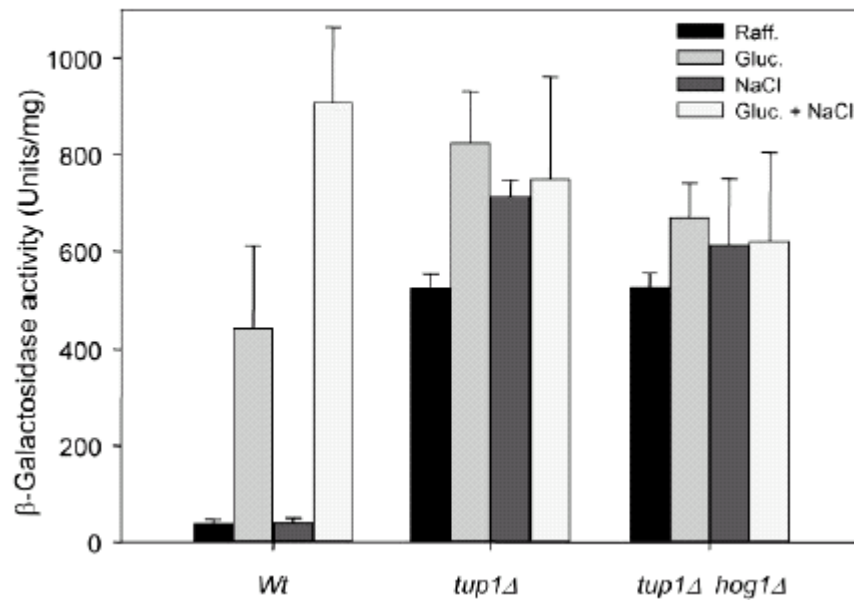
Apart from *sko1* mutants, we identified in our screening mutations in *TUP1* and *SSN6* genes. It is known that the Tup1-Ssn6 general co-repressor complex interacts with Sko1 to repress transcription of osmostress-regulated genes ([17](#), [18](#)). In addition, it is also known that the Tup1-Ssn6 complex interacts with Rgt1 to repress transcription of *HXT1* in low glucose conditions ([11](#), [38](#)). Consistent with these observations, mutations in *TUP1* or *SSN6* resulted in constitutive expression of *HXT1* that was not significantly enhanced by addition of glucose or NaCl ([Fig. 5B](#); data not shown for the *ssn6D* mutant). As expected, deletion of *HOG1* in a *tup1D* strain did not affect *HXT1* expression. Therefore, our data suggest that two transcriptional

repressors, Sko1 and Rgt1, are controlling *HXT1* gene expression by their binding to the Tup1-Ssn6 complex.

Figure 5. The Sko1-Tup1-Ssn6 complex controls *HXT1* expression under the control of the Hog1 MAPK.

A, *Hog1* regulates *HXT1* expression through the *Sko1* transcriptional factor. Wild type (W303-1A), *sko1Δ*, *hog1Δ*, and *sko1Δhog1Δ* strains (**A**), and wild type (W301-1A), *tup1Δ* and *tup1Δhog1Δ* cells (**B**) were transformed with the appropriated centromeric *pHXT1-lacZ* plasmids. Transformants were treated and analyzed as in Fig. 1. In **A**: values are mean *b*-galactosidase activities from four to six transformants expressed in Miller units. In **B**: *b*-galactosidase activity (units/mg) was measured in cell extracts; values are mean *b*-galactosidase activities from four to six transformants (bars represent S.D.).



B

6.- Sko1 controls *HXT1* transcription by direct binding to the promoter.

Chromatin immunoprecipitation (ChIP) analyses have shown that the Hog1 MAPK is actively recruited to osmostress responsive promoters [(2), (35)]. Consistently, our ChIP analyses showed that Hog1 was also recruited to *HXT1* promoter in response to osmostress (data not shown). To test whether Sko1 was also present at the *HXT1* promoter, we also utilized ChIP analysis. As shown in Fig. 6A, Sko1 was present at the *HXT1* promoter in cells growing in raffinose. Addition of NaCl resulted in a decrease of Sko1 binding that was more pronounced than the one observed by glucose treatment. Binding of Sko1 to *HXT1* promoter had the same properties as the binding of the repressor to the *GRE2* promoter, a gene known to be regulated by Sko1 [Fig 6A, (35)].

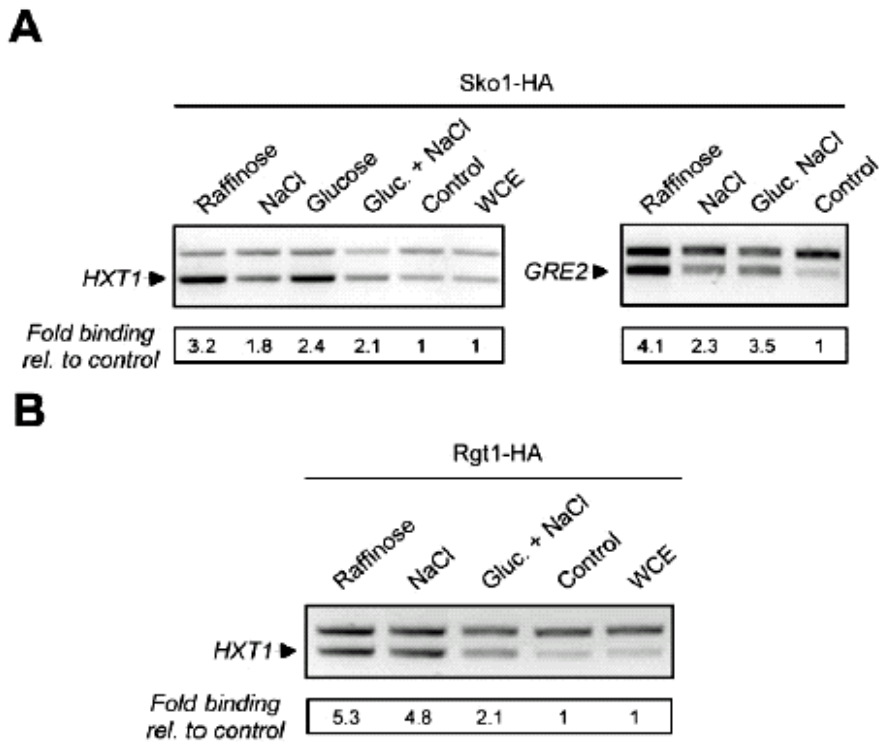


Figure 6. Both Rgt1 and Sko1 are bound to the *HXT1* promoter under low glucose conditions as detected by ChIP analysis.

Strains containing genomic tags of Sko1-HA (A) or Rgt1-HA (B) were grown in the presence of raffinose, and samples for ChIP analyses were taken before (Raffinose) or after 15 min of a pulse of 2% glucose (Gluc), 0.4 M NaCl (NaCl), or 2% glucose plus 0.4 M NaCl (Gluc + NaCl). Immunoprecipitations were performed by using mouse anti-HA monoclonal antibodies. PCR was performed with primers spanning the promoter region of *HXT1*, *GRE2*, and control oligonucleotides spanning the *GAL1* gene region. The exact primer sequences are available upon request. Control lanes show DNA amplified from extracts from cells without tagged protein (Control), or prior to immunoprecipitation (WCE, represents whole cell extract diluted 1:500). Data represents -fold increase over control without tag. Quantification was performed using Quantity One software from Bio-Rad.

ChIP analyses from several groups have described the presence of Rgt1 at the *HXT1* promoter in the absence of glucose and its release in response to a pulse of glucose [(9), (15), (26)]. Consistent with these results, we found Rgt1 present at the *HXT1* promoter in cells growing in raffinose, but its binding was not affected by osmostress (Fig. 6B). As expected, binding of Rgt1 to the *HXT1* promoter was diminished in the presence of glucose plus NaCl (Fig. 6B). Taking all these results together, we suggest that in cells growing in low-glucose conditions, Sko1 and Rgt1 are present at the *HXT1* promoter and co-repress gene transcription.

7.- Regulation of *HXT1* expression is mediated by the coordinated regulation of Rgt1 and Sko1 transcriptional activities

Analysis of the *HXT1* promoter (see above) showed that a small region between -521 to -223 contained possible Rgt1 and Sko1 regulatory elements that could be critical to understand the relationship between the HOG and glucose signalling pathways in the regulation of *HXT1* expression. To analyse this relationship at the promoter level, we investigated a promoter fragment of *HXT1* containing from -521 to -220 in a *CYC-lacZ* reporter vector under the same growth conditions as above. As shown in figure 7, this 301 bp fragment was able to repress transcription of the *CYC-lacZ* system in low-glucose medium and derepressed transcription in response to glucose or to glucose plus NaCl, similarly to what we observed when we used the full length promoter in a wild type strain (Fig. 1). Rgt1 was still able to play a negative role in the regulation of this fragment in low-glucose, since deletion of *RGT1* increased expression under this condition. Interestingly, osmostress, but not glucose, fully induced expression of the reporter in a *rgt1D* strain, indicating that when there is no Rgt1, the release of Sko1 by the activation of the HOG pathway results in full expression of the reporter. Consistently, the lack of Sko1 results in defective derepression by NaCl and no overinduction of the

reporter by the combined action of glucose plus osmostress. In addition, the simultaneous deletion of *RGT1* and *SKO1* led to constitutive expression of the reporter construct under any condition. Therefore, Rgt1 and Sko1 acted independently but co-ordinately to regulate expression of *HXT1* in response to glucose and osmostress. Our results also suggest that full *HXT1* expression requires the activity of both, glucose induction and HOG signalling pathways to eliminate both repressing activities, Rgt1 and Sko1.

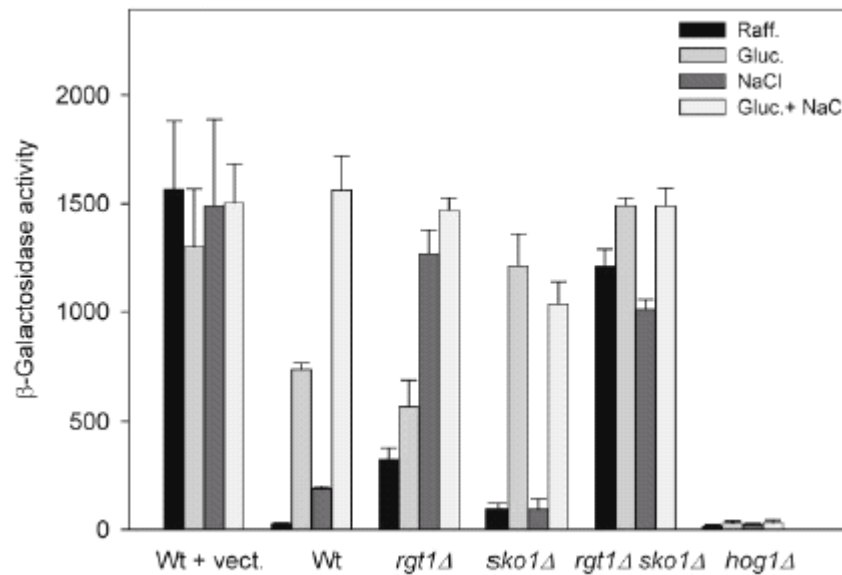


Figure 7. The *HXT1* promoter is regulated coordinately by the HOG and the glucose signaling pathways.

An empty vector *pJS205* (*vect.*) or a vector containing the region of the promoter of *HXT1* that comprises from *_521* to *_220* into *pJS205* was transformed into several yeast strains. Transformants were treated and analyzed as in Fig.4. *β*-Galactosidase activity (units/mg) was measured in cell extracts, 60 min after the pulses, and it is the result of the measurement in triplicate of three independent transformants (bars represent S.D.).

DISCUSSION

Yeast cells are able to adjust cellular metabolism, gene expression and growth in response to environmental stimuli. In this sense, *Saccharomyces cerevisiae* can deal with an extremely broad range of sugar concentrations and can metabolise glucose, its most preferable carbon source, from higher than 1.5 M (as in drying fruits) down to micromolar concentrations. To be adapted to any environmental sugar condition, yeast have developed an unusual diversity of glucose transporter proteins (17 different Hxt'p) with specific individual properties and kinetics. *S. cerevisiae* has from low-affinity glucose transporters such as *HXT1* and *HXT3* (Km from 50 to 100 mM), that function when there is a good supply of sugar, to intermediate-affinity transporters such as *HXT2* and *HXT4* (Km around 10 mM), and high-affinity transporters such as *HXT6* and *HXT7* (Km around 1 mM), that function when the amount of the sugar is becoming scarce. Expression of all these transporter genes is tightly regulated at transcriptional level by the amount of substrate in the environment. Thus, the expression of *HXT1*, a low-affinity glucose transporter, is induced in the presence of glucose, whereas the expression of *HXT2* (intermediate-affinity) and *HXT6* (low-affinity) glucose transporters is repressed by the presence of the sugar [see (5), (17), (28) for review].

In this report, we show that full induction of *HXT1* expression requires the coordinated action of two independent signalling pathways, the glucose signalling and HOG signalling pathways. A plausible interpretation of this result could be that by increasing the expression of *HXT1* by hyperosmotic conditions, yeast could provide more substrate (glucose) for the synthesis of the osmoprotectant glycerol [see (14) for review on glycerol biosynthesis], to cope with the osmotic stress conditions. Activation of the glucose signalling pathway is mediated by the transmembrane glucose sensors Snf3 and Rgt2. On the other hand, activation of the HOG pathway can be mediated by two

independent sensing systems: the two-component sensor that involves the Sln1 histidine kinase and the Sho1 sensing system (6). It has been shown that both systems are capable of leading to Hog1 activation in response to changes in the extracellular osmolarity, however, they seem to react slightly different. The Sln1 sensor is able to sense small changes in the environment and induce progressive Hog1 activation, whereas the Sho1 sensing system induces full response but only once a threshold level of osmotic stress in the environment is reached (23). The different sensitivity of the two osmosensing systems was already studied under laboratory conditions but the physiological meaning of this different sensitivity has not been completely understood. Here, we show that small changes in extracellular sugar concentration, which results in small changes in extracellular osmolarity, are sufficient to induce Sln1-mediated Hog1 activation, whereas these changes are not high enough to induce Sho1 sensing system (Fig. 2). This different sensitivity of the two signalling systems might have a significant physiological role, since if under specific conditions only a partial activation of Hog1 MAPK is required, a fine tuning mechanism would avoid full induction of adaptive responses that might be too energy consuming for the cell.

Activation of the glucose signalling pathway by the presence of glucose leads to regulation of the Rgt1 transcriptional repressor. However, regulation of Rgt1 is not sufficient to induce gene expression by glucose without simultaneous activation of the HOG pathway. We also present strong evidence that the action of the HOG pathway is conducted *via* the Hog1 MAP kinase and the Sko1 transcriptional repressor. Our results also suggest that both repressors, Rgt1 and Sko1, interact with different regions of the *HXT1* promoter. We suggest that Rgt1 interacts, at least, with a promoter region located between -521 and -426. In fact this region is included in the fragment that was used to demonstrate a direct interaction of Rgt1 with *HXT1* promoter by either DNA-binding (29) or ChIP (26) analyses (fragment from -648 to -361). This region contains an spaced CGG pair sequence (⁻⁴⁸⁰CCG-

X₂₇⁻⁴⁵⁰CCG) that fulfils the requirements of the consensus sequence identified to be necessary for Rgt1 binding (15). However, additional sites for Rgt1 binding must exist since a promoter fragment containing only from –521 to ATG was not able to be properly induced by glucose. Since we have demonstrated that a promoter region from –821 to ATG contains all the regulatory regions of *HXT1*, we suggest that additional Rgt1 binding sites must be located in this –821 to –521 region. In fact we identified several spaced CGG pairs in this region (⁸⁰⁵CCG-X₃₀⁻⁷⁷²CCG; ⁻⁷⁶⁶CCG-X₂₇⁻⁷³⁶CCG). Thus, the (–821 to ATG) fragment would contain at least 3 spaced CGG pairs, in agreement with the described requirements for proper Rgt1 binding (15).

We also suggest that Sko1 interacts with a promoter region located between –426 and –223. However, we did not find any consensus Sko1-CRE site (TGACGTCA) in this region. Since the *HAL1* promoter contains a degenerated CRE site (TTACGTAA) that binds Sko1 functionally (12), we looked for degenerated sequences resembling the CRE_{HAL1} site and found one related sequence ⁻⁴¹⁵ATACGTAA⁻⁴⁰⁸. We mutagenized this site to ATATITAA in order to test its functionality but we only observed a slight increase in the induction of *HXT1* by glucose in comparison to the wild type promoter. Consistently, a *hog1D* mutant containing this mutated promoter improved only slightly the induction of *HXT1* by glucose (data not shown). These results indicated that either this site was not fully functional or that there were additional CRE-like sites in the sequence where Sko1 was able to bind.

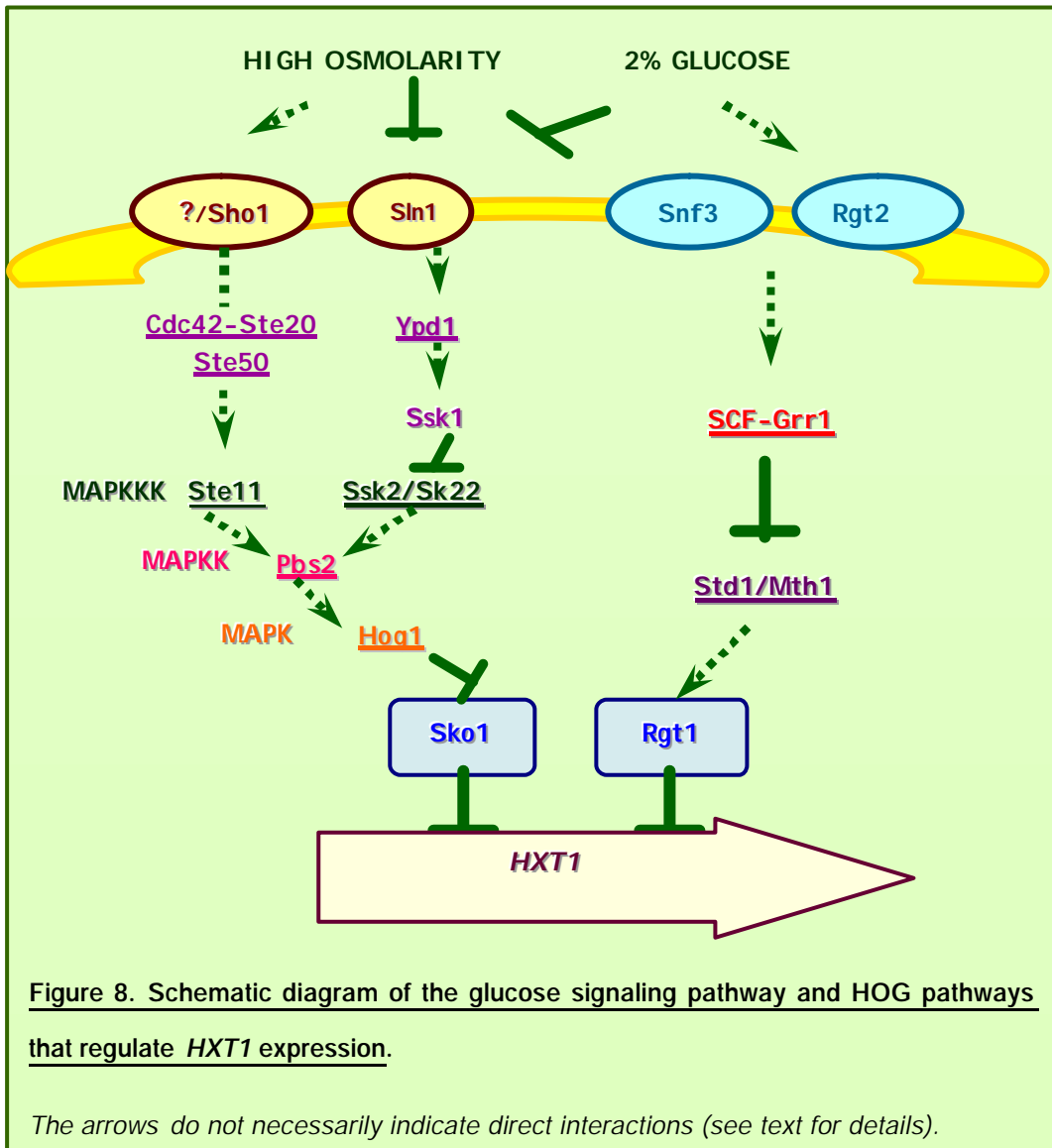
Our ChIP analyses data indicate that there is a positive interaction of Sko1 with the *HXT1* promoter in low-glucose conditions. The addition of NaCl decreases the binding of Sko1 to the *HXT1* promoter and improves the binding of the Hog1 MAPK, similarly to what it has been described for other osmostress inducible genes [(33), (35)]. Rgt1 also binds to *HXT1* promoter in low-glucose conditions, but addition of NaCl does not affect its binding. Since Rgt1 binding is only decreased by glucose [(9), (15), (26)], we suggest that

the addition of glucose to raffinose growing cells would have a dual effect. On one hand, it would release Rgt1 from the promoter and, on the other hand, acting glucose as an osmolite, it would activate the HOG pathway and would release Sko1 from the promoter, allowing in this way the derepression of *HXT1*. Consistent with this suggestion we have found that the addition of higher concentrations of glucose (4%) or the combined action of 2% glucose plus 0.4M NaCl improved *HXT1* expression.

It has been described that Sko1 inhibits transcription of several osmostress inducible genes through recruitment of the general co-repressor complex Tup1-Ssn6 [(12), (24), (34)]. Sko1 is phosphorylated by the Hog1 MAPK upon stress and this is crucial to switch Sko1-Tup1-Ssn6 from a repressor to an activator complex [(33), (35)]. At the same time, it is known that the Tup1-Ssn6 complex interacts with Rgt1 and plays a major role in repressing expression of *HXT1* under low-glucose conditions [(29), (43)]. Therefore, the Tup1-Ssn6 co-repressor complex seems to play a dual role in the regulation of *HXT1* expression. On one hand, it helps Sko1 to repress transcription under non-osmotic stress conditions and, on the other hand, it helps Rgt1 to repress transcription in the absence of glucose. Consistent with these suggestions, mutations in *TUP1* or *SSN6* resulted in constitutive expression of *HXT1* which was not significantly enhanced by the addition of either glucose, NaCl or both.

Taken all the results together, we propose the following model for *HXT1* gene regulation (see Fig. 8). Under normal conditions (low glucose and no osmostress), *HXT1* promoter would be repressed by two independent repressors, Rgt1 and Sko1. In response to glucose addition, two different pathways would activate *HXT1* gene expression. Glucose would directly activate the glucose signalling pathway, which would mediate regulation of the Rgt1 repressor, and the osmostress caused by the addition of glucose would result in activation of the Hog1 MAPK that would result in regulation of

the Sko1 repressor by the MAPK. Thus, the activity of two independent signalling pathways would converge in the regulation of *HXT1* expression by glucose and osmolarity.



ACKNOWLEDGMENTS

We are very grateful to Dr. Francisco Estruch, Dr. Karl-Dieter Entian, Dr. Markus Proft and Dr. Lynne Yenush for strains and plasmids, Eulàlia de Nadal for helpful advice and M. Carmona for technical assistance. L.T-C. was supported by a fellowship from the MCyT (Spain) and L.C. and G. M. are recipient of a F.P.U. pre-doctoral fellowship from the MEC, (Spain). This work was supported by grant BMC2002-00208 (to P.S.) from the Spanish Ministry of Science and Technology (MCyT) and grants from Ministry of Science and Technology PM99-0028 and BMC2003-00321, "Distinció de la Generalitat de Catalunya per a la Promoció de la Recerca Universitaria Joves Investigadors" DURSI (Generalitat de Catalunya) and the EMBO YIP program to F.P.

REFERENCES

1. Gancedo, J. M., and Gancedo, C. (1997) in *Yeast Sugar Metabolism* (Zimmermann, F. K., and Entian, K. D., eds) pp. 359–377, Technomic Publishing Co., Basel, Switzerland.
2. Gancedo, J. M. (1998) *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **62**, 334–361.
3. Ozcan, S., and Johnston, M. (1999) *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **63**, 554–569.
4. Rolland, F., Winderickx, J., and Thevelein, J. M. (2001) *Trends Biochem. Sci.* **26**, 310–317.
5. Li, F. N., and Johnston, M. (1997) *EMBO J.* **16**, 5629–5638.
6. Kishi, T., Seno, T., and Yamao, F. (1998) *Mol. Gen. Genet.* **257**, 143–148.

7. Mosley, A. L., Lakshmanan, J., Aryal, B. K., and Ozcan, S. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**, 10322–10327.

8. Lakshmanan, J., Mosley, A. L., and Ozcan, S. (2003) *Curr. Genet.* **44**, 19–25.

9. Schmidt, M. C., McCartney, R. R., Zhang, X., Tillman, T. S., Solimeo, H., Wolf, S., Almonte, C., and Watkins, S. C. (1999) *Mol. Cell Biol.* **19**, 4561–4571.

10. Lafuente, M. J., Gancedo, C., Jauniaux, J. C., and Gancedo, J. M. (2000) *Mol. Microbiol.* **35**, 161–172.

11. Tomas-Cobos, L., and Sanz, P. (2002) *Biochem. J.* **368**, 657–663.

12. Flick, K. M., Spielwoy, N., Kalashnikova, T. I., Guaderrama, M., Zhu, Q., Chang, H. C., and Wittenberg, C. (2003) *Mol. Biol. Cell* **14**, 3230–3241.

13. Hohmann, S. (2002) *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **66**, 300–372.

14. Alepuz, P. M., Jovanovic, A., Reiser, V., and Ammerer, G. (2001) *Mol. Cell* **7**, 767–777.

15. Alepuz, P. M., de Nadal, E., Zapater, M., Ammerer, G., and Posas, F. (2003) *EMBO J.* **22**, 2433–2442.

16. de Nadal, E., Casadome, L., and Posas, F. (2003) *Mol. Cell Biol.* **23**, 229–237.

17. Marquez, J. A., Pascual-Ahuir, A., Proft, M., and Serrano, R. (1998) *EMBO J.* **17**, 2543–2553.

-
-
18. Proft, M., and Serrano, R. (1999) *Mol. Cell. Biol.* **19**, 537–546.
19. Garcia-Gimeno, M. A., and Struhl, K. (2000) *Mol. Cell. Biol.* **20**, 4340–4349.
20. Proft, M., Pascual-Ahuir, A., de Nadal, E., Arino, J., Serrano, R., and Posas, F. (2001) *EMBO J.* **20**, 1123–1133.
21. Proft, M., and Struhl, K. (2002) *Mol. Cell* **9**, 1307–1317.
22. Maeda, T., Wurgler-Murphy, S. M., and Saito, H. (1994) *Nature* **369**, 242–245.
23. Mayordomo, I., and Sanz, P. (2001) *Yeast* **18**, 1309–1316.
24. Sikorski, R. S., and Hieter, P. (1989) *Genetics* **122**, 19–27.
25. Kuchin, S., Treich, I., and Carlson, M. (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**, 7916–7920.
26. Myers, A. M., Tzagoloff, A., Kinney, D. M., and Lusty, C. J. (1986) *Gene (Amst.)* **45**, 299–310.
27. Schuller, H. J., Hahn, A., Troster, F., Schutz, A., and Schweizer, E. (1992) *EMBO J.* **11**, 107–114.
28. Berben, G., Dumont, J., Gilliquet, V., Bolle, P. A., and Hilger, F. (1991) *Yeast* **7**, 475–477.
29. Ludin, K., Jiang, R., and Carlson, M. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**, 6245–6250.
-

-
-
- 30.** Sanz, P., Alms, G. R., Haystead, T. A., and Carlson, M. (2000) *Mol. Cell. Biol.* **20**, 1321–1328.
- 31.** Goldstein, A., and Lampen, J. O. (1975) *Methods Enzymol.* **42**, 504–511.
- 32.** Posas, F., Witten, E. A., and Saito, H. (1998) *Mol. Cell. Biol.* **18**, 5788–5796.
- 33.** Posas, F., Chambers, J. R., Heyman, J. A., Hoeffler, J. P., de Nadal, E., and Ariño, J. (2000) *J. Biol. Chem.* **275**, 17249–17255.
- 34.** Yale, J., and Bohnert, H. J. (2001) *J. Biol. Chem.* **276**, 15996–16007.
- 35.** Gasch, A. P., Spellman, P. T., Kao, C. M., Carmel-Harel, O., Eisen, M. B., Storz, G., Botstein, D., and Brown, P. O. (2000) *Mol. Biol. Cell* **11**, 4241–4257.
- 36.** de Nadal, E., Alepuz, P. M., and Posas, F. (2002) *EMBO Rep.* **3**, 735–740.
- 37.** Estruch, F. (2000) *FEMS Microbiol. Rev.* **24**, 469–486.
- 38.** Ozcan, S., Leong, T., and Johnston, M. (1996) *Mol. Cell. Biol.* **16**, 6419–6426.
- 39.** Kim, J. H., Polish, J., and Johnston, M. (2003) *Mol. Cell. Biol.* **23**, 5208–5216.
- 40.** Kruckeberg, A. L. (1996) *Arch. Microbiol.* **166**, 283–292.

41. Boles, E., and Hollenberg, C. P. (1997) *FEMS Microbiol. Rev.* **21**, 85–111.
42. Posas, F., and Saito, H. (1997) *Science* **276**, 1702–1705.
43. Thomas, B. J., and Rothstein, R. (1989) *Cell* **56**, 619–630.
44. Amoros, M., and Estruch, F. (2001) *Mol. Microbiol.* **39**, 1523–1532.
45. Schuller, H. J., and Entian, K. D. (1991) *J. Bacteriol.* **173**, 2045–2052.

CAPITULO III :

TOR kinase pathway and 14-3-3 proteins regulate glucose-induced expression of *HXT1*, a yeast low-affinity glucose transporter

TOR kinase pathway and 14-3-3 proteins regulate glucose-induced expression of *HXT1*, a yeast low-affinity glucose transporter

Lidia Tomás-Cobos, Rosa Viana and Pascual Sanz*

Short title: TOR kinase pathway and 14-3-3 proteins regulate *HXT1* expression.

Instituto de Biomedicina de Valencia (CSIC), Jaime Roig 11, 46010-Valencia, Spain.

Tel. 3496-3391760 ext. 111

Fax. 3496-3690800

e-mail: sanz@ibv.csic.es

*To whom the correspondence should be addressed

(Aceptado en *Yeast* (enero 2005), pendiente de publicación).

ABSTRACT

Expression of *HXT1*, a gene encoding a *Saccharomyces cerevisiae* low affinity glucose transporter, is regulated by glucose availability being activated in the presence of glucose and inhibited when the levels of the sugar are scarce. In this study we show that the TOR kinase pathway participates actively in the induction of *HXT1* expression by glucose. Inhibition of TOR kinase pathway by rapamycin treatment abolishes *HXT1* glucose induction. We suggest that the action of TOR kinase pathway is mediated by 14-3-3 proteins (known TOR kinase pathway related proteins), since in the absence of the latter, no induction of *HXT1* by glucose is observed. We also demonstrate that 14-3-3 proteins form a complex with Reg1, a regulatory subunit of Glc7 protein phosphatase, and that both interact physically with Grr1 (a component of the SCF-Grr1 ubiquitination complex), a key player in the process of *HXT1* induction by glucose.

Key words: TOR kinase pathway; 14-3-3 proteins; Bmh2; Reg1; SCF-Grr1; *HXT1*; glucose induction.

Abbreviations used: ECL, enhanced chemiluminescence; GAD, Gal4 activating domain; HA, hemagglutinin epitope; PCR, polymerase chain reaction; SC, synthetic complete medium; SDS-PAGE, sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis.

INTRODUCTION

In the presence of glucose, the yeast *Saccharomyces cerevisiae* is able to induce the expression of several genes, such as those encoding glycolytic enzymes, ribosomal proteins and some glucose transporters (see [1] and [2] for review). *HXT1* encodes a yeast low affinity glucose transporter whose expression is regulated by glucose availability, being activated in the presence of glucose and inhibited when the levels of the sugar are scarce (see [3] for review). In the last decade, genetic and biochemical studies have defined several components that are involved in the regulation of *HXT1* expression. Glucose availability in the surrounding medium is assessed by the sensor proteins Snf3 and Rgt2, which transmit this information to the internal cellular machinery ([4], [5]). This signal is transmitted through the SCF-Grr1 ubiquitination complex ([6], [7]) and finally modulates the activity of Rgt1, a transcription factor belonging to the Cys6-Zinc cluster protein family that acts as a repressor when glucose is absent ([8], [9]). Additional components of the glucose induction pathway are Std1 and Mth1, two proteins that bind to Rgt1 and modulate negatively *HXT1* expression ([3], [10]). Recent studies indicate that Std1 and Mth1 may also interact with the C-terminal tails of the glucose sensors Rgt2 and Snf3 ([11], [12]), and that the protein kinase Yck1 (casein kinase I) phosphorylates these components, being this modification necessary for their recognition by the SCF-Grr1 complex, that would signal them for degradation ([13], [14]). The degradation of Std1 and Mth1 would then lead to the glucose-induced dissociation of Rgt1 from the *HXT1* promoter and its activation ([13], [14]).

Another process that controls growth and metabolism in response to nutrient availability is the TOR kinase pathway ([15], [16], [17], [18], [19]). The key players in this pathway are the TOR protein kinases, Tor1 and Tor2, members of the phosphatidylinositol-related kinase family. This pathway is

inhibited by nitrogen starvation and by the drug rapamycin, a macrolide antibiotic with antiproliferative and immunosuppressive effects. Recently, it has been proposed that the TOR kinase pathway regulates, among other effects, the transcriptional response related to changes in both nitrogen and carbon source availability. As an example of the latter case, the TOR kinase pathway affects the subcellular localization of Msn2, a transcriptional activator of genes regulated by stress (STRE regulated genes), by regulating its interaction with Bmh2, a yeast member of the 14-3-3 protein family, that acts as a cytosolic anchor ([15], [20]).

In this paper we present evidence that the TOR kinase pathway is involved in regulating the transcriptional induction of *HXT1* by glucose. We suggest that the TOR kinase pathway, via the 14-3-3 proteins, is able to affect either directly or indirectly the activity of the SCF-Grr1 complex, regulating in this way the induction of *HXT1* by glucose.

MATERIALS AND METHODS

Strains and genetic methods

Saccharomyces cerevisiae strains JK9-3da (wild type, *MATa leu2-3,112 ura3-52 trp1 his4 rme1 GAL+ HMLa*) and JH11-1c (a *TOR1-1* derivative of JK9-3da) were a gift from Dr. M. Hall (Division of Biochemistry, Biozentrum, University of Basel, Switzerland) [15]. Strain FY250 (*MATa his3D200 leu2D1 trp1D63 ura3-52*) was a gift from Dr. F. Winston (Harvard Medical School, Boston, MA, USA). Strains S1278 (*MATa his3 leu2 trp1 ura3-52*) and S1278 *bmh1D bmh2D* were from Dr. G. Fink (Whitehead Institute for Medical Research, MIT, Cambridge, USA) [21]. Strain CTY10-5d (*MATa ade2 his3 leu2 trp1 gal4 gal80 URA3::lexAop-lacZ*) was a gift from Dr. R. Sternglanz (State University of New York, Stony Brook, USA).

Standard methods for genetic analysis and transformation were used. Yeast cultures were grown in synthetic complete (SC) medium lacking appropriate supplements to maintain selection for plasmids [22], supplemented with different carbon sources. When appropriated, cells were treated with 200 ng/ml of rapamycin (Calbiochem), from a stock of 100 mg/ml of the drug in methanol.

Plasmids

Plasmid pEG202-Grr1 was constructed in several steps; first we amplified by polymerase chain reaction (PCR) the coding region of the *GRR1* gene using oligos GRR1-1 (5'-AGAAGGATCCTAATGGATCAGGATAACAACAACC-3'; start codon is underlined) and GRR1-2 (5'-CGGCTCGAGTAGTCGACCAGTAAGTATTCAATGAAATAC-3') and genomic DNA from strain JK9-3da as a template. The amplified fragment was sequenced to

verify that the *Taq* polymerase had not introduced any undesired mutation. It was then digested with *Bam*HI and *Sall* and subcloned into pEG202 [23] and pWS93 [24] to obtain plasmids pEG202-Grr1 and pWS-Grr1. These plasmids produced functional LexA-Grr1 and HAGrr1 protein fusions that were able to complement the glucose signaling defects of a *grr1D* mutant strain (data not shown).

Episomal multicopy plasmids pHXT1-lacZ and pHXT2-lacZ were described in [25]. Centromeric monocopy plasmid pC-HXT1-lacZ was described in [26]. Centromeric plasmid pLC1-SUC2 was described in [27]. Plasmid pGAP1-lacZ was described in [28]. Other plasmids used in this study were pSK93 (empty) and pSK-Reg1 (HA-Reg1) [29]; pACTII (empty), pACTII-Reg1 (GAD-Reg1), pACTII-Bmh2 (GAD-Bmh2) and pEGGST- Bmh2 (GST-Bmh2) [30].

Invertase and β -galactosidase assays

Invertase activity was assayed in whole cells as previously described [31]. β -Galactosidase activity was assayed in permeabilized cells and expressed in Miller units as in [32].

Pull-down assays and immunoblot analysis

Preparation of protein extracts and pull-down assays were essentially as described previously [29]. Protein samples were separated by SDS-PAGE polyacrylamide gel electrophoresis and analyzed by immunoblotting using the corresponding anti-GST (Amersham) polyclonal or anti-HA (Boehringer Mannheim) monoclonal antibodies. Antibodies were detected by enhanced chemiluminescence with ECL or ECL Plus reagents (Amersham).

RESULTS AND DISCUSSION

1.- The TOR kinase pathway is involved in regulating *HXT1* induction by glucose

As it has been described at the Introduction, *HXT1* encodes a yeast low-affinity glucose transporter whose expression is regulated by glucose availability, being inhibited when the levels of glucose are scarce and activated in the presence of the sugar (see [3] for review). As it is shown in Fig. 1A, cells growing exponentially in 2% raffinose showed very low levels of *HXT1* expression (measured as a transcriptional fusion of the *HXT1* promoter to bacterial *lacZ* gene, encoding β -galactosidase enzyme; see Materials and Methods). When the cells received a pulse of 2% glucose, the expression of *HXT1* was induced (Fig. 1A, solid squares), in agreement with what it has been reported in the literature [3]. However, if cells growing in raffinose were treated 15 min prior to the pulse of glucose with rapamycin (200 ng/ml), an inhibitor of the TOR kinase pathway, no induction was observed (Fig. 1A, empty squares). To rule out the possibility that this effect was due to a general inhibition of transcription and/or translation caused by rapamycin, we analyzed the induction of a transcriptional fusion of the *GAP1* (general amino acid permease) promoter to bacterial *lacZ* gene [28] [it has been previously described that the expression of *GAP1* is induced by rapamycin ([19], [33])]. In agreement with published results, we found a strong induction of *GAP1* expression after treatment of glucose growing cells with rapamycin (200 ng/ml) (Fig. 1B). Therefore, the effect of rapamycin was specific on inhibiting *HXT1* induction by glucose.

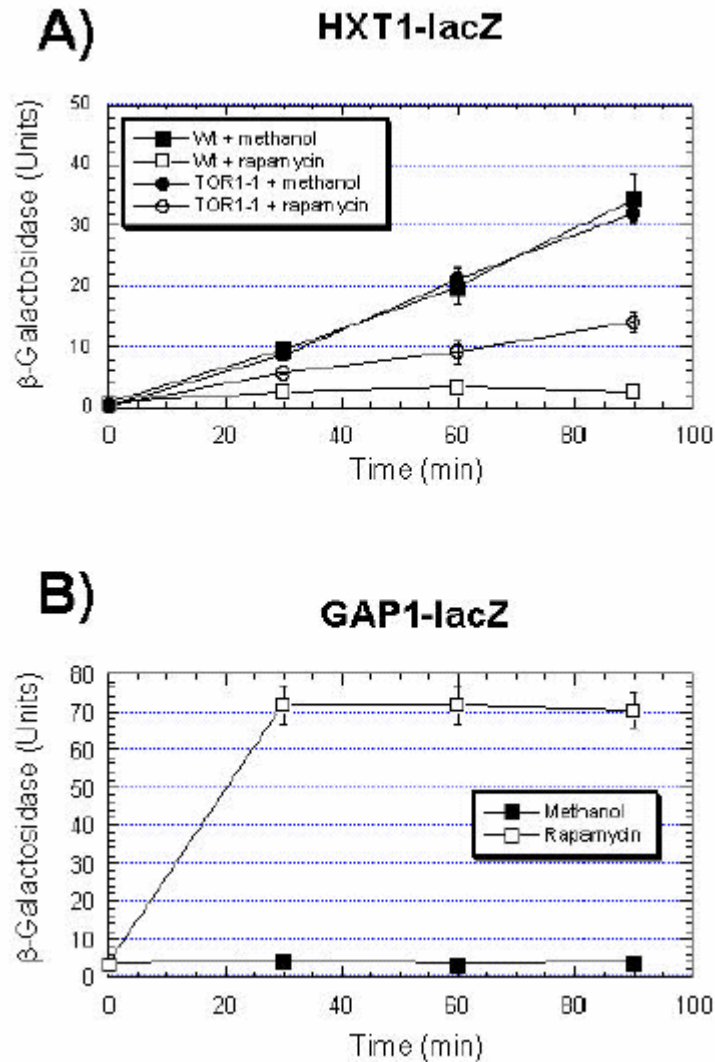


Figure 1. The TOR kinase pathway is involved in regulating *HXT1* induction by glucose.

A) Wild type (*JK9-3da*) or *TOR1-1* cells were transformed with centromeric plasmid *pC-HXT1-lacZ* [26]. Transformants were grown to exponential phase in selective SC-2% raffinose plus 0.05% glucose medium. Cells were then pulsed with 2% glucose (final conc.). Fifteen min prior to the pulse, cells were treated with 200 ng/ml of rapamycin

(final conc.) or with the corresponding quantity of methanol. Aliquots were taken at different times after the pulse and the *b*-galactosidase activity measured. **B)** Wild type cells (JK9-3da) were transformed with plasmid pGAP1-lacZ [28]. Transformants were grown to exponential phase in selective SC-2% glucose. Cells were then treated with 200 ng/ml rapamycin (final conc.) or with the corresponding quantity of methanol. Aliquots were taken at different times and the *b*-galactosidase activity measured. In part A) and B), values are the mean enzymatic activities from four transformants of each strain (bars represent standard deviation).

In order to confirm that the effect of rapamycin on *HXT1* glucose induction was due to an inhibition of the TOR kinase pathway, we used a mutant in the Tor1 protein kinase which makes it partially insensitive to rapamycin (*TOR1-1*; [19]). We found that in the *TOR1-1* mutant, the addition of the drug did not prevent the induction of *HXT1* expression upon addition of glucose (Fig 1A, empty circles). Taken all these results together we suggest that the TOR pathway is actively involved in the induction of the expression of *HXT1* by glucose. These results were in agreement with data from microarray analyses that indicated that *HXT1* expression was diminished in rapamycin treated cells ([16], [34], [35]).

Our results also complemented recent observations that indicate that the TOR kinase pathway is involved in the post-translational regulation of the levels of Hxt1 protein in response to glucose [36]. Therefore, inhibition of TOR kinase pathway by rapamycin not only affects *HXT1* gene expression (our results), but also affects post-translational regulation of the levels of Hxt1 protein in the cell [36].

2.- Induction of *HXT1* by glucose is prevented in the absence of 14-3-3 proteins

It has been recently proposed that TOR kinase pathway controls the expression of nutrient regulated genes by sequestering several nutrient-responsive transcription factors in the cytoplasm ([15], [19]). Among other effects, TOR pathway regulates the subcellular localization of Msn2 and Msn4, a pair of redundant transcriptional activators of STRE (stress response element)-regulated genes, by promoting the association of Msn's with the 14-3-3 yeast proteins Bmh1 and Bmh2 ([15], [20]). In order to know if Msn2 and Msn4 were involved in the regulation of the expression of *HXT1* by glucose, we used a double *msn2Dmsn4D* mutant. However, we found a similar pattern of *HXT1* expression in this mutant as in wild type (data not shown), indicating that these two transcriptional factors were not involved in regulating *HXT1* expression.

We then tested if yeast 14-3-3 proteins could be involved in the regulation of *HXT1* expression by glucose by using a double *bmh1D bmh2D* mutant. It is known that a double *bmh1D bmh2D* mutant is lethal in most genetic backgrounds but it is still viable in the S1278b background [21]. Using mutants in this background we observed a complete absence of induction of *HXT1* expression by glucose (Fig. 2 and Table I; the difference in the magnitude of the *HXT1* expression in glucose growing cells between the two experiments is due to the fact that in Fig. 2 we used a centromeric monocopy based plasmid whereas in Table I we used an episomal multicopy based plasmid containing the transcriptional fusion of *HXT1* promoter to bacterial *lacZ* gene). This effect was not due to alterations in glucose uptake since the expression of *SUC2* (a gene encoding invertase, whose expression is repressed by the Snf1 protein kinase pathway in response to glucose) in this double mutant was correctly repressed by the sugar as in the wild type (Table

I; [30]). We also tested the expression of *HXT2*, a high-affinity glucose transporter whose expression is repressed by glucose [3] and found that in the double mutant the regulation of *HXT2* by glucose was similar to wild type (Table I). Therefore, we suggest that yeast 14-3-3 proteins were involved specifically in the induction of *HXT1* by glucose.

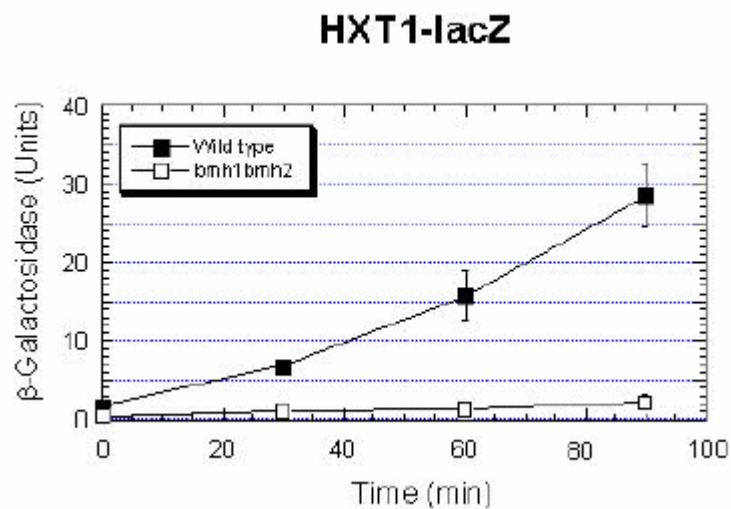


Figure 2. Induction of *HXT1* by glucose is prevented in the absence of 14-3-3 proteins.

Wild type (S1278) or *bmh1D bmh2D* cells were transformed with centromeric plasmid pCHXT1-lacZ [26]. Transformants were grown to exponential phase in selective SC-2% raffinose plus 0.05% glucose medium. Cells were then pulsed with 2% glucose (final conc.). Aliquots were taken at different times after the pulse and the *β*-galactosidase activity measured. Values are the mean enzymatic activities from four transformants of each strain (bars represent standard deviation).

Table I: Induction of *HXT1* by glucose is prevented in the absence of 14-3-3 proteins.

Wild type (*S1278*) and double *bmh1D* *bmh2D* mutant cells containing the episomal multicopy plasmids *pHXT1-lacZ*, *pHXT2-lacZ* [25] or the centromeric monocopy plasmid *pLC1-SUC2* [27] and growing exponentially in 2% raffinose (*Raff*) or 2% glucose (*Gluc*) were harvested. Invertase and *b*-galactosidase were measured as described in Materials and Methods section. Values of invertase are means from three different transformants (S.D. <10% in all cases) and values for *b*-galactosidase (Miller Units) are means from four to six transformants (S.D. <15 % in all cases).

Strain	pHXT1-LacZ β-galactosidase (Units)		pHXT2-LacZ β-galactosidase (Units)		pLC1-SUC2 Invertase (Untis)	
	Raff	Gluc	Raff	Gluc	Raff	Gluc
Wild type	11	849	205	49	175	2
<i>bmh1D</i> <i>bmh2D</i>	6	33	222	92	160	4

3.- 14-3-3 protein Bmh2 interacts physically with Grr1 via Req1

Since 14-3-3 proteins were involved in the induction of *HXT1* expression by glucose, we decided to study the putative proteins that interacted with Bmh's in this process. We have recently described a two-hybrid screening using LexA-Bmh2 as bait [37]. However, among the proteins that interacted with Bmh2, none of them was related to the glucose induction

pathway. Nevertheless, in an additional study [30] we demonstrated an specific interaction between Bmh's and Reg1, a regulatory subunit of the Glc7 protein phosphatase complex, and we also suggested an involvement of 14-3-3 proteins and Reg1 in the process of catabolite inactivation of maltose permease, being this participation independent from the glucose repression pathway governed by the Snf1 protein kinase complex [30]. Since some of the components involved in triggering the glucose-induced inactivation of maltose permease (catabolite inactivation) are also involved in the process of *HXT1* induction by glucose (i.e. Grr1, Rgt2, ...) ([30], [38], [39], [40]), we decided to study the physical interaction of Bmh2 or Reg1 with some of these components. We found no interaction between Bmh2 or Reg1 and Rgt1, a transcriptional factor involved in *HXT1* regulation (see Introduction), using either two-hybrid analysis or co-immunoprecipitation methods. The same negative results were obtained when we assayed the interaction between Bmh2 or Reg1 and Std1 or Mth1, negative regulators of Rgt1 (see Introduction). However, we found a strong two-hybrid interaction between Reg1 and Grr1, a component of the SCF-Grr1 ubiquitination complex (see Introduction) (Table II). Grr1 also interacted with Bmh2 but only when Reg1 was present. These interactions were confirmed by pull-down analyses (Fig. 3).

Since Grr1 is a key player in the process of *HXT1* induction by glucose, our results suggest that TOR kinase pathway, via the 14-3-3 proteins, could affect either directly or indirectly the activity of the SCF-Grr1 complex, regulating in this way the induction of *HXT1* by glucose. It has been described that Grr1 is an F-box protein that only recognizes phosphorylated substrates ([41], [42]). Since 14-3-3 proteins bind also to phosphorylated proteins ([43], [44]), we suggest that 14-3-3 proteins could assist Grr1 in recognizing its corresponding phosphorylated substrates. Alternatively, since it has been described that SCF-Grr1 complex is involved in the inactivation of Mth1 [13],

it could be speculated that Mth1 and/or other effectors could be modified by the TOR kinase pathway to allow its recognition by the SCF-Grr1 complex. However, this possibility seems unlikely since it has been recently proposed that yeast casein kinase I (Yck1) is in charge of the phosphorylation of Mth1 and Std1 in response to glucose [14].

Table II: Bmh2 and Reg1 interact physically with Grr1.

CTY10.5d cells expressing the LexA-Grr1 fusion and the corresponding Gal4-activating domain (GAD)-Reg1 or GAD-Bmh2 protein fusions were grown to exponential phase in selective SC-2% glucose medium. When indicated, the pSK93 (empty) or the pSK-Reg1 plasmids were introduced in the corresponding transformants and cells grown as above. Values are mean β -galactosidase activities from four to six transformants (S.D. <15% in all cases).

LexA-Fusions	GAD-Fusions		β -Galactosidase (Units)
LexA-Grr1	GAD		1.3
LexA-Grr1	GAD-Reg1		21.6
LexA	GAD-Reg1		1.0
LexA-Grr1	GAD-Bmh2	pSK93	1.6
LexA-Grr1	GAD-Bmh2	pSK-Reg1	11.0
LexA-Grr1	GAD	pSk-Reg1	1.0

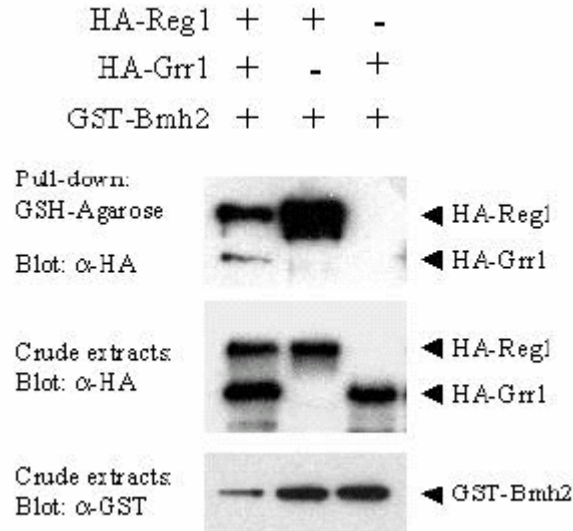


Figure 3. Grr1, a component of the SCF-Grr1 ubiquitination complex, interacts physically with Reg1 and Bmh2.

Protein extracts (500 μ g) were prepared from FY250 glucose growing cells expressing HA-Grr1 (pWS-Grr1), HA-Reg1 (pSK-Reg1) and GSTBmh2 (pEG-GST-Bmh2) or the corresponding empty vectors pWS93 and pSK93. GSTBmh2 fusion proteins were pulled-down with glutathione-agarose. Pelleted proteins were analyzed by SDS-PAGE and immunodetected with anti-HA monoclonal antibodies (upper panel). Proteins in the input crude extracts (5 μ g) were also immunodetected with either anti-HA (middle panel) or anti-GST (lower panel).

ACKNOWLEDGEMENTS

We are very grateful to Dr. R. Sternglanz, Dr. F. Winston, Dr. M. Hall and Dr. G. Fink for strains and Dr. F. Estruch, Dr. del Castillo and Dr. S. Ozcan for plasmids. This work has been supported by Spanish Ministry of Science and Technology Grant BMC2002-00208. L.T-C. is supported by a FPI fellowship from the Spanish Ministry of Science and Technology.

REFERENCES

1. Johnston, M. (1999) *Trends Genetics* 15, 29-33.
2. Rolland, F., Winderickx, J. and Thevelein, J.M. (2001) *Trends Biochem Sci* 26,310-317.
3. Ozcan, S. and Johnston, M. (1999) *Microbiol Mol Biol Rev* 63, 554-569.
4. Ozcan, S., Dover, J., Rosenwald, A.G., Wolfi, S. and Johnston, M. (1996) *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 12428-12432.
5. Ozcan, S., Dover, J. and Johnston, M. (1998) *EMBO J* 17, 2566-2573.
6. Li, F.N. and Johnston, M. (1997) *EMBO J* 16, 5629-5638.
7. Kishi, T., Seno, T. and Yamao, F. (1998) *Mol Gen Genet* 257, 143-148.
8. Ozcan, S., Leong, T. and Johnston, M. (1996) *Mol Cell Biol* 16, 6419-6426.

- 9.** Mosley, A.L., Lakshmanan, J., Aryal, B.K. and Ozcan, S. (2003) *J Biol Chem* 278, 10322-10327.
- 10.** Lakshmanan, J., Mosley, A.L. and Ozcan, S. (2003) *Curr Genet* 44, 19-25.
- 11.** Schmidt, M.C., McCartney, R.R., Zhang, X., Tillman, T.S., Solimeo, H., Wolfi, S., Almonte, C. and Watkins, S.C. (1999) *Mol Cell Biol* 19, 4561-4571.
- 12.** Lafuente, M.J., Gancedo, C., Jauniaux, J.C. and Gancedo, J.M. (2000) *Mol Microbiol* 35, 161-172.
- 13.** Flick, K.M., Spielewoy, N., Kalashnikova, T.I., Guaderrama, M., Zhu, Q., Chang, H.C. and Wittenberg, C. (2003) *Mol Biol Cell* 14, 3230-3241.
- 14.** Moriya, H. and Johnston, M. (2004) *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 1572-1577.
- 15.** Beck, T. and Hall, M.N. (1999) *Nature* 402, 689-692.
- 16.** Cardenas, M.E., Cutler, N.S., Lorenz, M.C., Di Como, C.J. and Heitman, J. (1999) *Genes Dev* 13, 3271-3279.
- 17.** Schmelzle, T. and Hall, M.N. (2000) *Cell* 103, 253-262.
- 18.** Rohde, J., Heitman, J. and Cardenas, M.E. (2001) *J Biol Chem* 276, 9583-9586.
- 19.** Crespo, J.L. and Hall, M.N. (2002) *Microbiol Mol Biol Rev* 66, 579-591.
- 20.** Mayordomo, I., Estruch, F. and Sanz, P. (2002) *J Biol Chem* 277, 35650-35656.

-
-
- 21.** Roberts, R.L., Mosch, H.U. and Fink, G.R. (1997) *Cell* 89, 1055-1065.
- 22.** Rose, M.D., Winston, F. and Hieter, P. (1990) in: *Methods in Yeast Genetics, A laboratory course manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- 23.** Golemis, E.A., Serbriiskii, I., Gyuris, J. and Brent, R. (1997) in: *Current Protocols in Molecular Biology*, Chapter 20.1, Vol. 3, pp. Chapter 20.1 (Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A. and Struhl, K., Eds.), John Wiley & Sons.
- 24.** Song, W. and Carlson, M. (1998) *EMBO J.* 17, 5757-5765.
- 25.** Ozcan, S. and Johnston, M. (1995) *Mol Cell Biol* 15, 1564-1572.
- 26.** Mayordomo, I. and Sanz, P. (2001) *Yeast* 18, 1309-1316.
- 27.** del Castillo, L., Nieto, A. and Sentandreu, R. (1992) *Gene* 120, 59-65.
- 28.** Soussi-Boudekou, S. and Andre, B. (1999) *Mol Microbiol* 31, 753-762.
- 29.** Sanz, P., Alms, G.R., Haystead, T.A. and Carlson, M. (2000) *Mol Cell Biol* 20, 1321-1328.
- 30.** Mayordomo, I., Regelmann, J., Horak, J. and Sanz, P. (2003) *FEBS Lett* 544, 160-164.
- 31.** Jiang, R. and Carlson, M. (1996) *Genes Dev* 10, 3105-3115.
- 32.** Ludin, K., Jiang, R. and Carlson, M. (1998) *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 6245-6250.

- 33.** Beck, T., Schmidt, A. and Hall, M.N. (1999) *J Cell Biol* 146, 1227-1238.
- 34.** Hardwick, J.S., Kuruvilla, F.G., Tong, J.K., Shamji, A.F. and Schreiber, S.L. (1999) *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 14866-14870.
- 35.** Shamji, A.F., Kuruvilla, F.G. and Schreiber, S.L. (2000) *Curr Biol* 10, 1574-1581.
- 36.** Schmelzle, T., Beck, T., Martin, D.E. and Hall, M.N. (2004) *Mol Cell Biol* 24, 338-351.
- 37.** Mayordomo, I. and Sanz, P. (2002) *Biochem J* 365, 51-56.
- 38.** Jiang, H., Medintz, I. and Michels, C.A. (1997) *Mol Biol Cell* 8, 1293-1304.
- 39.** Jiang, H., Tatchell, K., Liu, S. and Michels, C.A. (2000) *Mol Gen Genet* 263, 411-422.
- 40.** Horak, J., Regelman, J. and Wolf, D.H. (2002) *J Biol Chem* 277, 8248-8254.
- 41.** Skowyra, D., Craig, K.L., Tyers, M., Elledge, S.J. and Harper, J.W. (1997) *Cell* 91, 209-219.
- 42.** Craig, K.L. and Tyers, M. (1999) *Prog Biophys Mol Biol* 72, 299-328.
- 43.** Muslin, A.J., Tanner, J.W., Allen, P.M. and Shaw, A.S. (1996) *Cell* 84, 889-897.
- 44.** Yaffe, M.B., Rittinger, K., Volinia, S., Caron, P. R., Aitken, A., Leffers, H., Gamblin, S. J., Smerdon, S. J. and Cantley, L. C. (1997) *Cell* 91, 961-971.

DISCUSION

Los nutrientes, además de aportar la energía necesaria para el metabolismo celular, son capaces de regular la expresión génica. Por este mecanismo los organismos, tanto superiores como inferiores, pueden adaptarse continuamente a las variaciones ambientales (4).

Para estudiar las bases moleculares del proceso de inducción génica por glucosa desarrollamos distintas estrategias de trabajo cuyos resultados se presentan en los capítulos I-III utilizando como sistema modelo la levadura *Saccharomyces cerevisiae*.

Para la levadura *S. cerevisiae* la glucosa es la fuente de carbono preferida, y la presencia de este azúcar provoca cambios en la maquinaria celular que proporcionan un uso eficiente y exclusivo del mismo. Estos cambios incluyen una regulación de la expresión génica, de modo que la glucosa activa a genes cuyos productos son necesarios para su metabolismo, al mismo tiempo que reprime a los genes cuyas funciones están relacionadas con la asimilación y el metabolismo de fuentes de carbono distintas a la glucosa (3-5).

El gen *HXT1*, que codifica para el transportador de glucosa de baja afinidad de *Saccharomyces cerevisiae*, es uno de los genes cuya expresión génica está modulada por la concentración de glucosa. En condiciones de alta glucosa el gen *HXT1* se induce, mientras que en ausencia de glucosa su expresión se encuentra reprimida (1).

Son varias las moléculas que se han descrito dentro del mecanismo de regulación de la expresión de *HXT1* (9). Entre los elementos de dicho sistema se encuentra la Hexoquinasa II (*Hxk2*), la primera enzima de la glicólisis. Debido al fenotipo de un mutante *hxk2*, el cual es incapaz de expresar *HXT1* en alta glucosa, se ha considerado que la presencia de esta proteína es esencial para la inducción génica de *HXT1*, atribuyéndole un papel positivo en el mecanismo de expresión (9, 12).

Hxk2 también participa en la regulación del complejo kinasa Snf1, de forma que los mutantes simples *hxk2* presentan un complejo Snf1 activo independientemente de la concentración de glucosa (62). Teniendo en cuenta esta premisa no se puede afirmar que la falta de inducción de *HXT1* en un fondo génico mutante *hxk2* se deba únicamente a la acción directa de la Hexoquinasa en el mecanismo de inducción, sin considerar el efecto que produce un complejo Snf1 constitutivamente activo.

Para solucionar esta disyuntiva, se comprobó la relación entre la expresión de *HXT1* y el estado de activación del complejo Snf1. Resultados que se muestran en el capítulo I (página 45). En condiciones de inducción, 4% de glucosa, y en distintos fondos génicos se analizó la expresión de la fusión pC-HXT1-LacZ, en la que el promotor de *HXT1* está fusionado al gen que codifica para la actividad β -galactosidasa de *E.Coli*. Paralelo al estudio de inducción de la fusión pC-HXT1-LacZ, se midió la actividad del complejo Snf1 cuantificando para ello la actividad invertasa, producto del gen *SUC2* que está regulado positivamente por Snf1 (41).

Como se observa en la tabla II del capítulo I (página 57) en un mutante simple *hxk2* la expresión de *HXT1* está parcialmente inhibida respecto a la cepa silvestre y el complejo Snf1 presenta cierta actividad. Teniendo en cuenta que *S. cerevisiae* posee otra hexoquinasa, la kinasa Hxk1, se puede suponer que en ausencia de Hxk2 la hexoquinasa Hxk1 adopta su función. Efectivamente, como se observa en la línea 4 de la misma tabla, en un mutante doble *hxk1 hxk2* se obtiene un fenotipo más severo. Por un lado, la inducción del transportador *HXT1* está totalmente inhibida, y, por otro lado, el complejo Snf1 presenta una mayor activación (más de diez veces respecto al mutante simple *hxk2*). Para distinguir el efecto de la actividad del complejo Snf1 en la expresión de *HXT1* estudiamos el comportamiento del mutante *reg1*. Reg1 es la subunidad reguladora de la fosfatasa Glc7, y el complejo Reg1/Glc7 participa en el mecanismo de inactivación del complejo Snf1 (60-

62). Un mutante simple *reg1* se caracteriza por presentar un complejo Snf1 activo, incluso en condiciones de alta glucosa. Como se observa en la línea 6 de la tabla II (página 57) en un mutante simple *reg1* la expresión del transportador *HXT1* está reprimida, presentando el mismo fenotipo que un mutante doble *hvk1 hvk2* (línea 4 de la misma tabla). Según estos resultados, podemos decir que la activación del complejo Snf1 mediante la eliminación de uno de sus reguladores, bien Hvk2 o Reg1, causa el mismo efecto en la expresión de *HXT1*. Debido a que la posibilidad de que Reg1 y Hvk2, por sí mismos estuvieran implicados en la expresión de *HXT1*, quedó descartada al comprobar que la regulación de la expresión del transportador se recupera en tanto en el mutante doble *snf1 reg1* como en el mutante triple *hvk1 hvk2 snf1* (líneas 7 y 5), confirmándose el papel inhibitorio de la actividad de Snf1. Por otro lado, el hecho de que en estos mutantes (*snf1 reg1* y *hvk1 hvk2 snf1*) se mantenga la represión de *HXT1* en concentraciones bajas de glucosa incluso sin la presencia de Snf1, nos indica que el mecanismo de represión de *HXT1* no sólo depende de la actividad de Snf1.

Teniendo en cuenta que, en ausencia de glucosa, cuando el complejo kinasa Snf1 es activo, la inducción de *HXT1* está inhibida, los resultados de la tabla II implican la identificación de una nueva función de Snf1 en el control de la expresión génica, en la que el complejo Snf1 no sólo modula la expresión de genes reprimidos por glucosa, sino que también regula la expresión de genes inducidos por glucosa. Actuando del mismo modo que su homólogo en mamíferos, la kinasa AMPK (45, 51).

Para elucidar el mecanismo por el cual Snf1 inhibe la expresión de *HXT1* optamos por buscar una relación entre el complejo Snf1 y algún componente de la ruta de inducción. Entre las moléculas descritas en la regulación de de *HXT1* encontramos a Std1 como un posible intermediario entre Snf1 y la expresión de *HXT1*. Std1 se ha definido como regulador negativo de la expresión de *HXT1* (29), además de describirse como una

proteína que interacciona con Snf1 y que una sobreexpresión de Std1 activa a Snf1 en concentraciones altas de glucosa (93). El estudio más detallado de la interacción entre Std1 y Snf1 reveló dos hechos destacables (tabla 3 del capítulo I, página 59):

1) para que la interacción tenga lugar es estrictamente necesaria la presencia de un complejo Snf1 activo, como lo demuestra la falta de interacción con la forma mutante inactiva Snf1T210A.

2) la unión Std1-Snf1 se establece a través del dominio catalítico de Snf1.

Los resultados de la tabla 3 del capítulo I podrían explicar por qué la sobreexpresión de Std1 activa al complejo Snf1 incluso en condiciones de alta glucosa (93), ya que la interacción de Std1 con el dominio catalítico de Snf1 podría estabilizar al complejo abierto favoreciendo la activación. Sugiriendo al respecto que si Std1 participa en la activación de Snf1 también contribuye a la inhibición de *HXT1*. Profundizando en esta cuestión se estudió el efecto que produce la sobreexpresión de Std1 en la inducción génica del transportador teniendo en cuenta el estado de activación de Snf1. En la tabla 4 (capítulo I, página 60) se puede apreciar que en condiciones de inducción (alta glucosa), al sobreexpresar Std1 en presencia de un complejo Snf1 activo (pWS-Snf1) se inhibe la expresión de *HXT1*. Sin embargo, la sobreexpresión de Std1 no tiene consecuencias en la expresión del transportador *HXT1* si tiene lugar en presencia de un complejo Snf1 cerrado e inactivo, como lo son las formas mutantes Snf1T210A y Snf1K84R. Concluyéndose que el efecto negativo de la sobreexpresión de Std1 en la expresión de *HXT1* está mediado por Snf1.

Std1 se ha caracterizado como regulador negativo de la expresión de *HXT1* debido al fenotipo que presenta un mutante simple *std1*, en el que la inducción no está reprimida en concentraciones bajas de glucosa (20). Por otro lado, el factor transcripcional Rgt1 se ha identificado como represor de *HXT1* en ausencia de glucosa, por lo que, un mutante *rgt1* presenta un

expresión de *HXT1* desreprimida en ausencia de glucosa (26). Dada la similitud fenotípica de los mutantes simples *std1* y *rgt1*, se estudió si las funciones de estas proteínas están relacionadas. El ensayo del doble híbrido y la técnica de arrastre muestran que, efectivamente, Std1 y Rgt1 interaccionan entre sí (tabla 5 y figura 1, páginas 62 y 63, respectivamente). Sin embargo, debido a que la sobreexpresión de Std1 activa Snf1, no se pudo determinar si la interacción está regulada por glucosa.

Al comprobar que dos reguladores negativos de la expresión de *HXT1*, Std1 y Rgt1 interaccionan entre sí, se hace más plausible la hipótesis de que las funciones de estos dos elementos estén relacionadas. Teniendo en cuenta que la sobreexpresión de Std1 anula la inducción de *HXT1* en presencia de un complejo Snf1 activo (tabla 4, página 60), se analizó el efecto que produce la sobreexpresión de Rgt1. Sin embargo, como se aprecia en la tabla 6 (capítulo I, página 64), la sobreexpresión de Rgt1 por sí sola no afecta a la expresión de *HXT1*, aunque, la sobreexpresión conjunta de Rgt1 y Std1 revierte el efecto inhibitorio de la sobreexpresión de Std1. Puesto que la sobreexpresión de Std1 activa a Snf1, el resultado de la tabla 6 (página 64) sugiere que el exceso de Rgt1 contrarresta la activación de Snf1, no inhibiéndose la expresión de *HXT1*. Por lo que Rgt1 es capaz de atenuar la actividad de Snf1. Puesto que Snf1 y Rgt1 no interaccionan entre sí (datos no mostrados), los resultados obtenidos nos llevan a plantear la hipótesis de que Std1 aproxima al complejo Snf1 al factor transcripcional Rgt1, formándose un macrocomplejo que modula la expresión de *HXT1*. Para comprobar si Std1 intercede como molécula puente entre Snf1 y Rgt1 analizamos el comportamiento de un mutante *std1*. Dado que determinados elementos de la ruta de inducción pueden enmascarar la función de Std1 hicimos uso de un mutante múltiple en los sensores de glucosa (Rgt2 y Snf3) y en el homólogo de Std1 (Mth1).

En la tabla 7 de la página 66 se observa que el mutante cuádruple *rgt2 snf3 mth1 std1* presenta una expresión constitutiva de *HXT1*, independiente

de la concentración de glucosa, como ya indicaban otros autores (20). Lo que demuestra el carácter represor de Std1 y Mth1, ya que, sin la presencia de los sensores no se transmite la señal de glucosa, y aún así se expresa *HXT1*. Sin embargo, si observamos la actividad invertasa, ésta es prácticamente nula en baja glucosa, lo que se traduce en complejo Snf1 no funcional. Luego la expresión de *HXT1* en este mutante no puede atribuirse únicamente a la falta de Std1. Para elucidar el efecto de Std1 se activó artificialmente al complejo Snf1 construyendo para ello el mutante séxtuple *rgt2 snf3 mth1 std1 hxk1 hxk2*. En este caso, en presencia de un complejo Snf1 constitutivamente activo el transportador no se expresa, ni en alta ni en baja glucosa, e independientemente de la función de Std1. Estos resultados nos confirman dos ideas que hemos observado anteriormente:

- 1) Std1 participa en la activación del complejo Snf1, como lo demuestra la falta de desrepresión del gen *SUC2* en el mutante cuádruple *rgt2 snf3 mth1 std1*.
- 2) Un complejo Snf1 activo inhibe la expresión de *HXT1*, como se deduce del comportamiento del mutante séxtuple *rgt2 snf3 mth1 std1 hxk1 hxk2*.

Como se ha descrito en otros casos la regulación de la expresión génica implica modulación de los factores transcripcionales. Si consideramos que la actividad kinasa de Snf1 es un requisito para la inhibición de *HXT1*, y que Std1 es un intermediario entre Snf1 y el represor Rgt1, podemos suponer que Snf1 modula la actividad de Rgt1, sugiriendo tres posibles mecanismos de acción de Snf1:

1. Promueva la degradación de Rgt1 en ausencia de glucosa.
2. Suscite un cambio de localización celular (como ya se ha descrito para otros factores transcripcionales, como Mig1) (41).

3. Fosforile a Rgt1; considerando que Rgt1 es una proteína en la que se han descrito al menos 30 sitios de fosforilación (94).

La primera hipótesis quedó descartada al comprobar los mismos niveles de proteína en una cepa silvestre, y en los mutantes simples *snf1* y *reg1*. El estudio de la fusión Rgt1-GFP (figura 2, página 68 del capítulo I) demostró que la localización celular de Rgt1 permanece constantemente en el núcleo independientemente de la concentración de glucosa y de la actividad de Snf1. Por otro lado, no se observó ningún cambio en la movilidad electroforética de Rgt1 dependiente de la actividad del complejo Snf1. Aunque este hecho no invalida la posibilidad de que Rgt1 sea sustrato de algún cambio post-traducciona. Posteriormente, se ha observado que Rgt1 se fosforila en alta glucosa, y que esta fosforilación modula su unión al promotor de *HXT1* (29).

Últimamente se ha descrito que la acción de muchos represores transcripcionales viene determinada por su interacción con el complejo general de represión Ssn6-Tup1 (35), como es el caso de Mig1 o Sko1 (36, 74). Basándonos en el comportamiento de un mutante simple *ssn6*, el cual presenta una expresión constitutiva de *HXT1* incluso en ausencia de glucosa (12), comprobamos directamente si el factor transcripcional Rgt1 interactúa con el complejo general de represión Ssn6-Tup1 en condiciones de represión de *HXT1*. En la figura 3 del capítulo I (página 69) se confirma la hipótesis, al observar como la fusión GST-Ssn6 es capaz de reclutar a la fusión HA-Rgt1. Lo que nos lleva a considerar la posibilidad de que la expresión de *HXT1* puede estar regulada por la interacción de Rgt1 y el complejo general de represión Ssn6-Tup1.

Según los datos recogidos en el capítulo I postulamos un modelo que describe el mecanismo de regulación de *HXT1* (Figura 4, página 70). En condiciones de alta glucosa, en presencia de un complejo Snf1 inactivo, la

señal leída por el sensor de membrana Rgt2 se transmite a través del complejo de ubiquitinación SCF-Grr1 hasta el factor transcripcional Rgt1, que deja de interactuar con el complejo Ssn6-Tup1, y por tanto, de inhibir la expresión de *HXT1*. Por el contrario, en un estado de baja glucosa, el complejo Snf1 se activa, al fosforilarse en la treonina 210, cambiando a una conformación abierta. En estas condiciones, Std1 aproxima al complejo Snf1 a Rgt1, propiciando la interacción de Rgt1 con el complejo Ssn6-Tup1, y, por tanto, inhibiendo la expresión génica de *HXT1*.

Continuando con el análisis de la regulación de la expresión de *HXT1* de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* estudios posteriores nos permitieron demostrar que la expresión de dicho gen no sólo está regulada por el sistema de señalización por glucosa, sino que además se requiere la actividad de la ruta HOG, ruta de señalización de estrés osmótico (64). Los resultados se muestran en el capítulo II (página 77).

En la figura 1 del capítulo II (página 77), se puede observar que la expresión del gen del transportador *HXT1* se activa en concentraciones altas de glucosa (2% de glucosa), mientras que ausencia de este monosacárido la expresión permanece inactiva. Cabe resaltar el hecho de que en condiciones de glucosa y 0,4M de NaCl la expresión es mucho mayor que en presencia de sólo glucosa. Este efecto no es específico de NaCl, ya que en presencia de glucosa y otro tipo de estrés osmótico, como 1M de sorbitol, este fenómeno también ocurre. Estos resultados son similares a los obtenidos en estudios de microarrays, en los que un choque hiperosmótico en presencia de glucosa es capaz de inducir la expresión génica del transportador de glucosa de baja afinidad (65-67).

Ante un estrés osmótico *S. cerevisiae* responde activando la ruta HOG. El eje central de esta ruta está formado por una cascada de MAP kinasas, en la que la kinasa Hog1 modula la actividad de distintos factores

transcripcionales regulando así la expresión génica (64). Al observar una sobreexpresión de *HXT1* en presencia de glucosa y estrés osmótico, quisimos determinar si la ruta HOG estaba implicada en el efecto de sobreactivación de la expresión.

Del estudio de la expresión de la fusión pC-HXT1-LacZ en un mutante simple *hog1* (figura 1 de la página 89 del capítulo II) llama particularmente la atención el hecho de que este mutante no expresa la fusión en ninguna condición ensayada, destacando la importancia de Hog1 para activar la expresión de *HXT1*, ya que se requiere incluso en condiciones normales de inducción por glucosa. Pero además, no sólo se precisa de su presencia, sino que la actividad kinasa también es fundamental, ya que, el simple mutante *hog1* recupera el fenotipo silvestre de expresión de *HXT1* al complementar la mutación con una forma activa de la MAP kinasa, mientras que si se hace uso de una forma inactiva de Hog1 (Hog1KS-KN) se mantiene la inhibición de la expresión.

A partir del resultado anterior se podría pensar que Hog1 participa de alguna forma en la expresión de otros transportadores de glucosa. Sin embargo, la expresión de una fusión del promotor de *HXT2* al gen LacZ muestra el mismo comportamiento en un mutante *hog1* que en una cepa silvestre, indicando que el efecto de la ruta HOG es específico sobre la expresión del gen *HXT1*.

En el capítulo I (página 45) habíamos determinado que el complejo Snf1 activo es capaz de inhibir la expresión de *HXT1*, por lo que cabía la posibilidad de que Hog1 regulara la expresión de *HXT1* indirectamente, de modo que, la MAP Kinasa y la actividad del complejo Snf1 estuvieran relacionadas. Sin embargo, un mutante simple *hog1* (tabla 2 de la página 91) no muestra un fenotipo típico de desrepresión por glucosa, es decir, no presenta un complejo Snf1 activo en condiciones de una concentración alta

glucosa en el medio, demostrándose que Hog1 no participa en la activación de Snf1. Además, tanto en un mutante simple *hog1* como en un mutante doble *snf1 hog1* no se expresa el transportador *HXT1* en presencia de una concentración alta glucosa, lo que revela que el papel que desempeña la kinasa Hog1 en la expresión de *HXT1* es esencial e independiente de la actividad Snf1.

Para caracterizar hasta qué nivel la ruta HOG interviene en la expresión de *HXT1*, analizamos el comportamiento de la fusión pC-HXT1-LacZ en una serie de fondos génicos mutantes en distintos elementos de la ruta de respuesta a estrés osmótico. Los resultados, detallados en la figura 2A (página 93-94, capítulo II), permiten concluir que la cascada de MAP kinasas es básica para el desarrollo de la expresión de *HXT1*, como lo demuestra la falta de inducción incluso en condiciones de “sólo glucosa” de los mutantes en la MAPKK Pbs2 y las MAPKKK Ste11 y Ssk2/Ssk22. Por otro lado, de los dos mecanismos osmosensores que posee la ruta HOG (64) el sistema de dos componentes Sln1-Ypd1-Ssk1, que se activa ante pequeñas variaciones en la osmolaridad extracelular, es quien media la expresión de *HXT1* en condiciones de alta glucosa, ya que la mutación doble *sho1 ste11*, mutación en dos componentes del otro sistema osmosensor, presenta el mismo fenotipo de inducción que la cepa silvestre. En cambio en un mutante *ssk2 ssk22* sólo se induce a *HXT1* en condiciones de glucosa y NaCl, condiciones que producen un mayor estrés osmótico y que, por tanto, activan a la ruta HOG a través de la rama del osmosensor Sho1.

Al comprobar que la actividad de Hog1 es un requisito imprescindible para la expresión de *HXT1* en condiciones de glucosa. Se cuestionó la causa de la activación de esta MAP kinasa en estas condiciones, considerando dos posibilidades, una que la adición de glucosa en una concentración de 2% al medio provoque un estrés osmótico que active a Hog1, o bien, que la glucosa como tal active a Hog1. Como la activación de Hog1 en presencia

de estrés osmótico ocurre por fosforilación (64), estudiamos el estado de fosforilación de la proteína en distintas condiciones, resultados que se presentan en la figura 2B de la página 94 (capítulo II). Partiendo de células creciendo en una concentración de 2% de rafinosa se añadió al medio por separado dos azúcares, glucosa y galactosa a una concentración final de 2%, así como NaCl a una concentración final de 110mM, dando lugar a la forma fosforilada de Hog1 en los tres casos. De forma que, si la adición de un azúcar diferente a la glucosa tiene el mismo efecto que ésta, y la cinética de fosforilación por glucosa presenta el mismo patrón que el descrito para NaCl (figura 2C), se puede concluir que es la adición de glucosa al 2%, y no la glucosa como tal, quien actúa como osmolito activador a Hog1.

Hasta el momento se había definido a la ruta de inducción por glucosa como la única ruta que regula la expresión de *HXT1* (9). Sin embargo, según nuestros resultados podemos afirmar que son dos las rutas que participan en el mecanismo de regulación de la expresión génica del transportador de glucosa de baja afinidad. Puesto que para el funcionamiento de ambas rutas se precisa la presencia de glucosa, puede ser que exista una conexión entre ambas rutas o que sean dos rutas independientes.

Del análisis de la ruta de inducción génica por glucosa se confirma que la presencia de glucosa es requisito imprescindible para la expresión de *HXT1* (Figura 3, páginas 96y 97). De ahí que, las moléculas Rgt2, Snf3 y Grr1, que señalizan la presencia de glucosa en el medio sean esenciales para la inducción de *HXT1*, como lo demuestra la falta de expresión de los mutantes *rgt2 snf3* y *grr1* en cualquier condición (figura 3A página 96). Sin embargo, es destacable el comportamiento del mutante doble *std1 mth1*. Este mutante que se caracteriza por tener una expresión desregulada de *HXT1* (20), todavía es capaz de responder a la señal de estrés osmótico

incrementando la expresión del gen *HXT1*, siendo la kinasa Hog1 la responsable de esta sobreexpresión, como lo demuestra la ausencia de esta respuesta en un mutante triple *std1 mth1 hog1*.

Por otro lado, Rgt1 es un factor transcripcional represor de *HXT1*, cuyo asentamiento sobre el promotor está regulado por Std1 y Mth1 (33). Un mutante *rgt1* (figura 3B, página 97) no responde a la señal de glucosa, de modo que, en ausencia de ésta el gen *HXT1* se halla levemente desreprimido, y se induce ligeramente en presencia de este azúcar. No obstante, este mutante responde al estrés osmótico, como lo muestran los altos niveles de inducción alcanzados tanto en condiciones de NaCl como de glucosa y NaCl. Esta inducción inusual en condiciones de estrés osmótico es consecuencia de la actividad de la ruta HOG, ya que la inactivación de ésta en un mutante doble *rgt1 hog1* inhibe la expresión de *HXT1*.

La falta de expresión del mutante doble *hog1 rgt1* parece indicar que el factor transcripcional Rgt1 y la kinasa Hog1 son dos moléculas claves para la expresión de *HXT1*. La actividad represora de Rgt1 está regulada por fosforilación, de modo que, en condiciones de alta glucosa Rgt1 se fosforila y se libera del promotor de *HXT1* (29). Podría ser que Hog1 regulara de alguna forma la actividad de Rgt1. Así pues, ensayamos la actividad de la fusión LexA-Rgt1 en un fondo génico *hog1*, fusión que como se aprecia en la tabla 3 (página 98) tiene capacidad autoactivante en concentraciones altas de glucosa. Sin embargo, encontramos que esta actividad se sigue conservando en un mutante *hog1*, lo que nos lleva a concluir que la función de Rgt1 es independiente de la actividad kinasa Hog1.

Si en la expresión de un mismo gen, *HXT1*, intervienen dos rutas de señalización diferentes de forma independiente, debe ser porque en la región del promotor existen al menos dos elementos de respuesta para

cada ruta. Para desarrollar esta hipótesis analizamos la región del promotor tratando de definir y acotar, si se daba el caso, las zonas implicadas en la expresión. Diseñamos y construimos un conjunto de fusiones de distintas regiones del promotor de *HXT1* al gen LacZ de E.Coli (figura 4A, página 99), efectuando un seguimiento de la expresión génica en dos fondos génicos distintos: uno fondo silvestre y un fondo mutante *rgt1*, único factor represor descrito en el mecanismo de regulación de la expresión de *HXT1* (figuras 4B y 4C, página 100).

Los resultados obtenidos exponen que a partir de la región -223/ATG la expresión es constitutiva e independiente de las condiciones ensayadas, y que conforme se amplía la secuencia del promotor aparecen restricciones en la inducción génica, manifestándose por un lado que el sistema está regulado principalmente por un mecanismo de represión, y por otro lado, que la región que contiene a los elementos reguladores se halla entre las posiciones -821 y -223. La falta de expresión en condiciones de glucosa que diferencia el comportamiento entre el segmento -223/ATG y el fragmento -426/ATG nos indica que existe un elemento represor en la región comprendida entre las posiciones -223 y -426. Además, no se trata del factor transcripcional Rgt1, ya que la no inducción del segmento -426/ATG se mantiene incluso en un mutante *rgt1* (figura 4C, página 100). De la comparación de los fragmentos -426/ATG y -521/ATG se puede definir la región represora de Rgt1, localizándose entre los puntos -426 y -521, ya que como puede observarse en el histograma, la falta de expresión en condiciones de NaCl de la secuencia -521/ATG se recupera en un mutante *rgt1*. No siendo ésta la única región en la que Rgt1 ejerce su función represora, debido a que en la región -821 y -521 existe una represión de la expresión dependiente de Rgt1.

Según el estudio del promotor de *HXT1* podemos decir que al menos existe otro factor transcripcional distinto a Rgt1, que depende de la

activación de la ruta HOG, y que la acción conjunta de los represores modula la expresión del transportador de glucosa de baja afinidad. También hemos definido las regiones reguladas por Rgt1, regiones que, por un lado, coinciden con los estudios de unión del factor transcripcional al promotor de otros autores (29), además de contener pares CCG, que son las secuencias diana de Rgt1.

Para identificar al otro factor de transcripción represor de *HXT1* analizamos la secuencia la región del promotor. En el rastreo encontramos la presencia de secuencias generales de respuesta a estrés, los llamados elementos STRE, que son regiones dianas de los factores transcripcionales Msn2 y Msn4 (69). Sin embargo, un mutante doble *msn2 msn4* alcanza los mismos niveles de expresión en todas las condiciones que una cepa silvestre. Por lo que estos factores transcripcionales no participan en el mecanismo de regulación.

Teniendo en cuenta que la inhibición de los dos posibles represores da lugar a una expresión constitutiva de *HXT1*, buscamos el represor desconocido a través de un estudio de supresión fenotípica en mutantes obtenidos por el tratamiento con MNG sobre un fondo génico *rgt1*. De los mutantes seleccionados se establecieron grupos de complementación, que permitieron identificar a Ssn6, Tup1 y Sko1 como moléculas, que junto a Rgt1, participan en la represión de *HXT1*. La aparición de Ssn6 y Tup1 entre los mutantes seleccionados corroboró el papel que ejerce el complejo general represor en la regulación de la expresión de *HXT1*, como ya habían visto otros autores y nosotros mismos en otro trabajo (26 y 95), además de servir como controles positivos de la estrategia diseñada y utilizada en la caracterización del otro represor de *HXT1*. La identificación de Sko1 introdujo un posible nuevo elemento en el mecanismo de regulación del transportador. Al ser Sko1 un represor transcripcional cuya actividad está regulada por la ruta HOG, y que interacciona con el complejo general

represor Ssn6-Tup1, parecía bastante factible pensar que trataba del otro regulador transcripcional del gen *HXT1* (74).

Para describir la función de Sko1 en la regulación de la expresión de *HXT1*, ensayamos el comportamiento de un mutante *sko1*. En la figura 5A (páginas 103 y 104) se aprecia claramente que este mutante presenta el mismo nivel de expresión en condiciones de glucosa que en condiciones de glucosa más NaCl, de forma que, se ha perdido el efecto de sobreexpresión que produce el estrés osmótico en una cepa silvestre. Es de subrayar el comportamiento del mutante doble *sko1 hog1*, ya que el mutante doble recupera la falta de expresión de un mutante simple *hog1* en respuesta a glucosa. Así pues, se comprueba que efectivamente Sko1 forma parte del mecanismo de expresión de *HXT1*, y que su actividad represora está regulada por Hog1.

Los mutantes *tup1* y *ssn6* tienen el mismo fenotipo de expresión, presentando una expresión constitutiva en todas las condiciones ensayadas (en la figura 5B sólo se muestra al mutante *tup1*). Este proceder es similar al mostrado por el fragmento -223/ATG (figura 4B, páginas 100), en el que se han eliminado los elementos represores. Este resultado permite concluir que los dos represores definidos en la expresión de *HXT1*, Rgt1 y Sko1, actúan junto al complejo general represor, Ssn6-Tup1, además de que el sistema de regulación de la expresión de *HXT1* se basa principalmente en la desrepresión, como ya indicábamos anteriormente.

En el análisis del promotor de *HXT1* (figura 4, páginas 99 y 100) se delimitó una pequeña región comprendida entre -521 y -223 que respondía tanto a las señales de glucosa como de NaCl, indicando que debía contener los elementos represores. Para comprobar esta hipótesis ensayamos el comportamiento de esta pequeña región (de -521 a -220) en distintos fondos génicos (figura 7, página 107). En primer lugar, cabe resaltar que

esta región de 301 pb en una cepa silvestre presenta el mismo comportamiento que toda la secuencia del promotor, demostrando que, efectivamente en este fragmento se hallan elementos reguladores de la expresión que responden a las señales de glucosa y NaCl. Al eliminar Rgt1, el sistema no responde a la señal de glucosa, expresándose *HXT1* tanto en rafinosa como en glucosa prácticamente con la misma intensidad. De modo que, este mutante *rgt1* al tener como único represor a Sko1, sólo responde a la señal de NaCl, siendo capaz de expresar *HXT1* sólo en condiciones de estrés salino cuando se activa la ruta HOG. Siguiendo el mismo razonamiento anterior, un mutante simple *sko1* sólo obedece a la señal de glucosa, y, por tanto, presenta la misma expresión en condiciones de glucosa y glucosa más NaCl, puesto que en este mutante *sko1* el único represor de *HXT1* es Rgt1, y la acción de este elemento está regulada por el sistema de inducción por glucosa. En el caso del mutante doble *rgt1 sko1*, se eliminan los dos represores y, por tanto, la expresión tiene lugar de forma constitutiva. De esta forma se confirma la función represora de las dos moléculas. Por otro lado, el ensayo de inmunoprecipitación de cromatina de la figura 6 (página 105) es una clara evidencia de como la liberación de dichos factores del promotor responde a dos señales distintas, NaCl para Sko1, y glucosa para Rgt1. Concluyendo que la expresión de *HXT1* responde a la acción independiente de dos rutas de señalización, la ruta HOG y la ruta de inducción por glucosa, que regulan la función represora de dos factores de transcripción distintos, Sko1 y Rgt1, respectivamente.

Considerando los resultados obtenidos en el capítulo II postulamos un modelo para el mecanismo de expresión de *HXT1* (página 112). En condiciones de ausencia de glucosa la expresión de *HXT1* está inhibida por los represores, Rgt1 y Sko1, que se hallan sobre el promotor. La llegada de glucosa al medio provoca dos tipos de señal. Una que hace referencia a la especificidad de la fuente de carbono en sí, y por tanto, es leída por el sensor

Rgt2. La otra señal generada viene determinada por el choque osmótico que se produce al aumentar la concentración de glucosa, y se trasmite a través del osmosensores de dos componentes (Sln1-Ypd1-Ssk1). Así pues, la llegada de glucosa activa a la ruta de inducción génica por glucosa y a la ruta HOG, que regulan la actividad de dos factores transcripcionales diferentes. La activación de la cascada de MAP kinasas inhibe al represor Sko1, de forma que el factor se libera del promotor de *HXT1*. Por otro lado, la señal de glucosa a través complejo SCF-Grr1 modula el estado de fosforilación de Rgt1, que en presencia de glucosa se fosforila y libera del promotor. De este modo, la glucosa libera al promotor de represores y permite la expresión de *HXT1*. El efecto de una mayor expresión de *HXT1* observado en presencia de glucosa y NaCl, y que dio origen a este trabajo, se puede explicar si consideramos que esta condición produce un estrés osmótico superior al provocado únicamente por un incremento de glucosa. Consecuentemente, se activa la ruta HOG totalmente, siendo más potente y eficaz en la eliminación la represión de Sko1, lo que se traduce en una mayor expresión de *HXT1*.

Los resultados de los capítulos I y II han permitido caracterizar nuevos elementos en el mecanismo de regulación del gen *HXT1* de *Saccharomyces cerevisiae* (95,96). Sin embargo, continua siendo una incógnita cómo la señal de glucosa recibida en la membrana es capaz de modular la expresión génica. Por lo que quisimos indagar en este aspecto, mostrando los resultados de este estudio en el capítulo III (página 119).

Para llevar a cabo el estudio de la transmisión de la señal de glucosa nos basamos en el hecho de que la levadura *Saccharomyces cerevisiae* además de las rutas específicas que señalizan un tipo de estrés, también presenta una ruta que señala el estado energético global de la célula. Esta ruta genérica es la ruta TOR, que regula la expresión de una gran variedad de genes que forman parte de diversos procesos celulares como: el inicio de la traducción de proteínas, la biogénesis de ribosomas, la autofagia, control de

fosfatasas y el metabolismo de nutrientes (metabolismo del nitrógeno y del carbono) (77).

Considerando a la ruta TOR como un gran sensor del estado metabólico y teniendo en cuenta que la detección de la presencia de glucosa es un requisito imprescindible para inducir la expresión de *HXT1* (como había quedado demostrado en el capítulo II), quisimos determinar si existía relación entre ambos procesos. Para inhibir a la ruta TOR hicimos uso de la rapamicina, compuesto que inactiva a las kinasas Tor que son elementos centrales de la ruta (76). En la figura 1 del capítulo III (páginas 128 y 129) se aprecia visiblemente una falta de inducción de *HXT1* en células tratadas con rapamicina, y que este efecto se debe a una inactivación de las kinasas Tor, ya que el fenotipo de expresión en alta glucosa se recupera en el mutante *TOR-1-1* que es menos sensible a la rapamicina. La ruta TOR regula la biogénesis de ribosomas y el inicio de la traducción (79), por lo que, se podría pensar que la falta de inducción de *HXT1* se debe a un defecto en la maquinaria transcripcional o traduccional, pero la expresión de un gen control *GAP1* (84) descartó esta posibilidad. Estos resultados nos llevaron a considerar la participación de la ruta TOR en la activación transcripcional de *HXT1*, además de ser una explicación de los estudios con rapamicina de otros autores, en los se observa una disminución de la expresión de este gen en células tratadas con rapamicina (85,92).

Se ha establecido que el mecanismo molecular por el cual la ruta TOR modula la expresión génica de genes regulados por nutrientes consiste en regular la localización celular de los factores transcripcionales (83,84), como es el caso de los factores transcripcionales de respuesta general a estrés, Msn2 y Msn4. En condiciones de no estrés Msn2 y Msn4 se mantienen en el citoplasma uniéndose a las proteínas Bmh3, que pertenecen a la familia de proteínas de anclaje citoplasmático 14-3-3, mientras que en condiciones de estrés una desfosforilación de los factores los desvincula de Bmh1/2 y se

internalizan en el núcleo. Sin embargo, en el caso de la expresión de *HXT1* la función de la ruta TOR no es la de modular la localización celular de Msn2 y Msn4, ya que como hemos visto anteriormente en el capítulo II estos factores no participan en la expresión de *HXT1*. Por lo que, postulamos que el nexo entre la ruta TOR y la expresión de *HXT1* debe encontrarse en la primeras etapas de la cascada de señalización, pudiéndose dar el caso de que las proteínas Bmhs secuestraran algún elemento de la transducción de la señal de la presencia de glucosa. Esta hipótesis se verificó al comprobar que en un mutante doble *bmh1 bmh2* la expresión de *HXT1* está inhibida (figura 2 y tabla I, páginas 131 y 132, respectivamente), y que se trata de un hecho específico ya que la doble mutación no afecta a otros transportadores, como es el transportador de glucosa de alta afinidad *HXT2*.

Debido a su función de anclaje molecular, las proteínas Bmhs son partícipes de múltiples procesos celulares (83,86). Recientemente, se ha descrito que estas proteínas junto a Reg1, están involucradas en la inactivación por catabolito de la maltasa permeasa. En dicho proceso, intervienen moléculas que también forman parte del sistema de inducción por glucosa como son entre otras el sensor de baja afinidad Rgt2 y el sistema de ubiquitinación SCF-Grr1 (89). Por lo que, cabía la posibilidad de que el complejo Bmh2-Reg1 formara parte del sistema de inducción por glucosa. El análisis de la interacción física de Reg1 y Bmh2 con los componentes del sistema de inducción demostró que Reg1 interacciona directamente con Grr1, mientras que Bmh2 interacciona con Grr1 de modo indirecto, ya que se precisa de la presencia de Reg1 para que dicha interacción tenga lugar (Figura 3 de la página 135).

Grr1 forma parte del sistema de ubiquitinación (SCF-Grr1) y se ha demostrado que participa en la cascada de señalización de glucosa, regulando la degradación de las moléculas Std1 y Mth1, que son moduladores negativos del factor transcripcional Rgt1 (20,33). Según este trabajo podemos

considerar que las proteínas Bmh2 son necesarias para transmitir la señal de glucosa, como lo demuestra la falta de inducción de un mutante doble *bmh1* *bmh2*, lo que por un lado incluye un nuevo elemento en el sistema de expresión de *HXT1*, y por otro lado, implica una nueva vía de transmisión de la presencia de glucosa, la ruta TOR.

CONCLUSIONES

1. La actividad de la proteína kinasa Snf1 de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* no sólo regula la expresión génica de genes reprimidos por glucosa sino que también participa en la expresión de genes inducidos por glucosa como es el gen *HXT1*.
2. La proteína Std1 interacciona físicamente con el dominio catalítico de la kinasa Snf1 siendo imprescindible un complejo Snf1 activo para que tenga lugar dicha interacción.
3. El factor transcripcional Rgt1 interacciona físicamente con Std1 en condiciones de baja glucosa.
4. La localización celular de la fusión Rgt1-GFP es nuclear e independiente de la concentración de glucosa.
5. El represor Rgt1 recluta al complejo general represor Ssn6/Tup1 para inhibir la transcripción de *HXT1*.
6. El mecanismo de regulación de la expresión de *HXT1* está basado principalmente en la represión transcripcional e implica la acción coordinada de dos rutas de señalización distintas e independientes: la ruta HOG y la ruta de inducción por glucosa.
7. La ruta HOG regula la expresión de *HXT1* a través del factor transcripcional Sko1, que reprime la expresión de *HXT1* uniéndose al promotor de *HXT1*.

-
-
8. El mecanismo de represión de los factores transcripcionales Rgt1 y Sko1 sobre la expresión de HXT1 depende del complejo general de represión Ssn6/Tup1.
 9. La ruta TOR participa en el sistema de regulación de la expresión de *HXT1*.
 10. Las proteínas 14-3-3 son imprescindibles para la expresión de *HXT1*.
 11. El macrocomplejo Grr1-Reg1-Bmh2 transmite la señal de glucosa y regula la expresión de *HXT1*.
-

BIBLIOGRAFIA

1. **Rolland, f., Winderickx, J., and Thevelein, J.M.** (2002). Glucose-sensing mechanism in yeast. *FEMS Yeast Research*, 2: 183-201.
2. **Kruckeberg, A.L., Walsh, M.C., and Van Dam, K.** (1998). How do yeast cells sense glucose?. *BioEssays* 20:972-976.
3. **Gancedo, J.M.** (1998). Yeast carbon catabolite repression. *Microbiology and Molecular. Biology Reviews.*62:334-361.
4. **Rolland, f., Winderickx, J., and Thevelein, J.M.** (2001). Glucose-sensing mechanism in eukaryotics cells. *TRENDS in Biochemical Sciences.* 26, 310-317.
5. **Carlson, M.** (1998). Regulation of the glucose utilization in yeast. *Current Opinion in Genetics & Development.* 8:560-564.
6. **Johnston, M** (1999). Feasting, fasting and fermenting-glucose sensing in yeast and other cells. *Trends in Genetics.* 15: 29-33.
7. **Jiang, H., Medintz, I., Zhang, B., and Michels, C.A.** (2000). Metabolic signals trigger glucose-induced inactivation of maltose permease in *Saccharomyces*. *Journal of Bacteriology.* 182:647-654.
8. **Hu, Z., Yue, Y., Jiang, H., Zhang, B., Sherwood, P., Michels, C.A.** (2000). Analysis of the mechanism by which glucose inhibits maltose induction of MAL gene expression in *Saccharomyces*. *Genetics* 154:121-132.

-
-
9. **Özcan, S., and Johnston, M.** Function and Regulation of Hexose Transporters. *Microbiology and Molecular Biology Reviews.* (1999). 63:554-569.
 10. **Boles, E., and C.P. Hollenberg.** (1997). The molecular genetics of hexose transporter in yeast. *FEMS Microbiol. Rev.*21:85-111.
 11. **Wieczorke, R., Krampe, S., Weierstall, T., Freidel, K., Hollenberg, C.P., and Boles, E.** (1999). Concurrent knock-out of at least 20 transporter genes is required to block uptake of hexoses in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Letters* 464:123-129.
 12. **Özcan, S., and Johnston, M.** (1995). Three different mechanism enable yeast hexose transporter *HXT* genes to be induced by different levels of glucose. *Molecular and Cellular Biology.* 15:1564-1572.
 13. **Wendell, D. L., and F. Bisson.** (1994). Expression of high-affinity glucose transport protein Hxt2p of *Saccharomyces cerevisiae* is both repressed and induced by glucose and appears to be regulated posttransductionally. *Journal of Bacteriology.* 176:3730-3737.
 14. **Krampe, S., O. Stamm, C.P. Hollenberg, and E. Boles.** (1998). Catabolite inactivation of the high-affinity hexose transporters Hxt6 and Hxt7 of *Saccharomyces cerevisiae* occurs in the vacuole after internalization by endocytosis. *FEBS Letters.*441: 343-347.
 15. **Özcan, S., Dover, J., and Johnston, M** (1998). Glucose sensing and signalling by two glucose receptors in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO Journal.* 17:2566-2573.

-
-
16. **Theodoris, G., and Bisson, L.F.** (2001). DDSE: downstream targets of the SNF3 signal transduction pathway. *FEMS Microbiology Letters*. 197: 73-77.

 17. **Vagnoli, P., Coons, D.M, Bisson, L.F.** (1998). The C-terminal domain of Snf3p mediates glucose-responsive signal transduction in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiology Letters*. 160:31-36.

 18. **Lafuente, J. M., Gancedo, C., Jauniaux, J-C., Gancedo, J. M.** (2000). Mth1 receives the signal given by the glucosa sensors Snf3 and Rgt2 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Microbiology*. 35:161-172.

 19. **Schulte, F. Wiczorcke, R., Hollenberg, C. P., Boles, E.** (2000). The HTR1 gene is a dominant mutant allele of the MTH1 and blocks Snf3- and Rgt2-dependent glucose signaling in yeast. *Journal of Bacteriology*. 182:540-542.

 20. **Schimdt, M.C., McCartney, R., Zhang, X., Tillman, T.S., Solimeo, H., Wölf, S., Almonte, C., and Watkins, S.C.** (1999). Std1 and Mth1 proteins interact with the glucose sensors Snf3 and Rgt2 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular. Biology*. 19: 4561-4571.

 21. **Moriya, H., and Johnston, M.** (2004). Glucose sensing and signaling in *Saccharomyces cerevisiae* through the Rgt2 glucose sensor and casein kinase I. *Proc. Natl. Acad. Sci USA*.101:1572-1577.

 22. **Hsiung, Y.G.m Chang, H., Pellequer, J-L., La Valle, R., Lanker, S., and Wittenberg, C.** (2001). F -box Protein Grr1 interacts with

-
-
- phosphorylated targets via the cationic surface of its leucine-rich repeat. *Molecular and Cellular Biology*. 21: 2506-2520.
23. **Hochstrasser, M** (2002). New proteases in an ubiquitin stew. *Science* 298: 549-552.
24. **Skowyra D., K. L. Craig, M. Tyers, S. J Elledge, and J. W. Harper.** (1997). F-box proteins are receptors that recruit phosphorylated substrates to the SCF ubiquitin-ligase complex. *Cell* 91: 209-219.
25. **Özcan, S., F. Schulte, K. Freidel, A. Weber, and M. Ciriacy.** (1994). Glucose uptake and metabolism in *grr1/cat80* mutants in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur. J. Biochem* 224: 605-611.
26. **Özcan, S., Leong, T., and Johnston, M.** (1996). Rgt1 of *Saccharomyces cerevisiae* a key regulator of glucose-induced genes is both an activator and repressor of transcription *Molecular and Cellular Biol.* 16: 6419-6426.
27. **Özcan, S., and Johnston, M.** (1996). Two different repressors collaborate to restrict expression of the yeast glucose transporter genes *HXT2* and *HXT4* to low levels of glucose. *Molecular and Cellular Biology*. 16:5536-5545.
28. **Jackson, J.C., and Lopes, J.M.** (1996) The yeast UME6 gene is required for both negative and positive transcriptional regulation of phospholipids biosynthetic gene expression. *Nucleic Acids Research*. 24:1322-1329.

-
29. **Mosley L., A., Laskshmanan, J. Aryal, B. Ozcan, S.** (2003). Glucose-mediated phosphorylation converts the transcription factor Rgt1 from a repressor to activator. *Journal of Biological Chemistry*. 278:10322-10327.
 30. **Kim, J-H., Polish, J., and Johnston, M.** (2003). Specificity and regulation of DNA-binding by the yeast glucose transporter gene repressor Rgt1. *Molecular and Cellular Biology*. 23: 5208-16.
 31. **Tillman, T.S., Ganster, R.W., Jiang, R., Carlson, M., Schmidt, M.C.** (1995). STD1 (MSN3) interacts directly with the TATA-binding protein and modulates transcription of the SUC2 gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Research*. 23:3174- 3180.
 32. **Ganster, R.W., Shen, W., and Schimdt, M.C.** (1993). Isolation of STD1, a high-copy-number suppressor of a dominant negative mutation in the yeast TATA-binding protein. *Molecular and Cellular Biology*. 13: 3650-3659.
 33. **Lakshmanan,J., Mosley, A. L., Ozcan,S.** (2003). Repression of transcription by Rgt1 in the absence of glucose requires Std1 and Mth1. *Currents. Genetics* 44: 19-25.
 34. **Flick, K.M., Spielewoy, N., Kalashnikova, T.I., Guaderrama, M., Zhu, Q., Chang, H.C., Wittenberg, C.** (2003). Grr1-dependent inactivation of Rgt1 from *HXT* gene promoters. *Molecular Biology Cell*. 14: 3130-41.
 35. **Varanasi, U.S, Klis, M., Mikesell, P.B., and Trumbly, R.** (1996). The Cyc8 (Ssn6)-Tup1 corepressor complex is composed of one Cyc8 and four Tup1 subunits. *Molecular and Cell Biology*. 16: 6707-6714.

-
-
36. **Treitel, M., Carlson, M.** (1995). Repression by Ssn6-Tup1 is directed by Mig1, a repressor/activator protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92: 3132-3136.
 37. **Hiesinger, M et al.** (2001). Contribution of Cat8 and Sip4 to the transcriptional activation of yeast gluconeogenic genes by carbon source-responsive elements. *Current Genetics*. 39: 68-76.
 38. **Bone, J., and Roth, S.Y.** (2000). Recruitment of the yeast Tup1-Ssn6p repressor is associated with localized decreases in histone acetylation. *The Journal of Biological Biochemistry*. 276:1808-1813.
 39. **Conlan, S.R., and Tzamarias, D.** (2001). Sfl1 functions via the co-repressor Ssn6-Tup1 and the cAMP-dependent protein kinase Tpk2. *Journal of Molecular Biology*. 309: 1007-1015.
 40. **Régnacq, M., et al.** (2001). Sut1p interaction with Cyc8p (Ssn6) relieves hypoxic genes from Cyc8-Tup1p repression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Microbiology*. 40: 1085-1096.
 41. **Treitel, M. A., S. Kuchin, M. Carlson.** (1998). Snf1 protein kinase regulates phosphorylation of the Mig1 repressor in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology*. 18: 6273-6280.
 42. **Lesage, P., X. Yang, and M. Carlson.** (1996). Yeast SNF1 protein kinase interacts with Sip4, a C₆ zinc cluster transcriptional activator: a new role for SNF1 in the glucose response. *Molecular and Cellular Biology*. 16: 1921-1928.

43. **Vincent, O., and M. Carlson.** (1998). Sip4, a Snf1 kinase-dependent transcriptional activator, binds to the carbon source-responsive element of gluconeogenic genes. *EMBO Journal*. 17: 7002-7008.

44. **Vincent, O., and Carlson, M.** (1999). Gal83 mediates the interaction of the Snf1 kinase complex with the transcriptional activator Sip4. *EMBO Journal*. 18:6672-6681.

45. **Hardie, D. G., D. Carling, M. Carlson.** (1998). The AMP-activated/SNF1 protein kinase subfamily: metabolic sensors of the eukaryotic cells?. *Annu. Rev. Biochem.* 67: 821-855.

46. **Schüller, H-J.** (2003). Transcriptional control of nonfermentative metabolism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Current Genetics*. 43: 139-160.

47. **Sanz, P.** (2003). Snf1 protein kinase: a key player in the response to cellular stress in yeast. *Biochemical Society Transactions* 31:178-181.

48. **Schmidt, M., and McCartney, R.R.** (2000). β -subunits of the Snf1 kinase are required for kinase function and substrate definition. *EMBO Journal*. 19: 4936-4943.

49. **Honigberg, S.M., and Lee, R.H.** (1998). Snf1 kinase connects nutritional pathway controlling meiosis in *Saccharomyces*. *Molecular and Cellular Biology*. 18:4548-4555.

50. **Yang, X., Jiang, R., and Carlson, M.** (1994). A family of proteins containing a conserved domain that mediates interaction with the yeast SNF1 protein kinase complex. *EMBO Journal*. 13: 5878-5868.

-
-
51. **Wood, A., Munday, M.R., Scott, J., Yang, X., Carlson, M., Carling, D.** (1994). Yeast SNF1 is functionally related to mammalian AMP-activated protein kinase and regulates acetyl-CoA. *The Journal Biological Chemistry*. 269:19509-19516.
 52. **McCartney, R.R., and Schmidt, M.** (2001). Regulation of the Snf1, activation requires phosphorylation of the threonin 210 by an upstream kinase as well as a distinct step mediated by the Snf4 subunit. *The Journal Biological Chemistry*. 276: 36460-36466.
 53. **Vincent, O., Townley, R., Kuchin, s., and Carlson, M.** (2001). Subcellular localization of the Snf1 kinase is regulated by the specific β subunits and a novel glucose signaling mechanism. *GENES & DEVELOPMENT* 15:1104-1114.
 54. **Vyas, V., Kuchin, S., Berkey, C.D., and Carlson, M.** (2003). Snf1 kinases with β -subunit isoforms play distinct roles in regulating haploid invasive growth. *Molecular and Cellular Biology*, 23: 1341-1348.
 55. **Alms, G.R., Sanz, P., Carlson, M., Haystead, T.A.** (1999). Reg1p targets protein phosphatase 1 to dephosphorylate hexokinase II in *Saccharomyces cerevisiae*: characterizing the effects of a phosphatase subunit on the yeast proteome. *EMBO Journal* 18:4157-4168.
 56. **Nath, N., McCartney, R., Schmidt, M.** (2003). Yeast Pak1 kinase associates with and activates Snf1. *Molecular and Cellular Biology*. 23:3909-3917.
 57. **Hong, S.P., Leiper, F.C., Woods, A., Carling, D., and Carlson, M** (2003). Activation of yeast Snf1 and mammalian AMP-activated protein

-
- kinase by upstream kinases. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 100(15), pp. 8839-8843.
58. **Halford, N.G., and Hardie, D.C.** (1998). SNF1-related protein kinases: global regulators of carbon metabolism in plants? Plant. Mol. Biol. 37, 735-748.
59. **Hawley, S.A., Boudeau, J., Reid, J.L., Mustard, K.J., Udds, L., Mäkela, T.P., Alessi, D.R., and Hardie, G.** (2003). Complexes between the LKB1 tumor suppressor, STRAD α/β and MO25 α/β are upstream kinases in the AMP-activated protein kinase cascade. Journal of Biology, 2:28.
60. **Tu, J. and Carlson, M.** (1995). REG1 binds to protein phosphatase type 1 and regulates glucose repression in *Saccharomyces cerevisiae*. EMBO Journal. 14:5939-5946.
61. **Ludin, K., Jiang, R. and Carlson, M.** (1998). Glucose-regulated interaction of a regulatory subunit of protein phosphatase 1 with the Snf1 protein kinase in *Saccharomyces cerevisiae*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 95: 6245-6250.
62. **Sanz, P., Alms, G. R., Haystead, T. A. and Carlson, M.** (2000). Regulatory interactions between the Reg1-Glc7 protein phosphatase and the Snf1 protein kinase. Molecular and Cellular Biology. 20: 1321-1328.
63. **Mayordomo, I., and Sanz, P.** (2001). Hexokinase PII: structural analysis and glucose signaling in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Yeast. 18: 923-930.
-

-
-
64. **Hohman, S** (2002). Osmotic Stress Signalling and Osmoadaptation in Yeast. *Microbiology and Molecular Biology. Reviews.* 62:300-372.
65. **Posas, F., J. R. Chambers, J. A. Heyman, J. P Hoeffler, E. Nadal, and J. Ariño.** (2000). The transcriptional response of yeast to the saline stress. *The Journal of Biological Chemistry.* 275: 17249-17255.
66. **Yale, J., and H. J. Bohnert.** (2001). Transcript expression in *Saccharomyces cerevisiae* at high salinity. *The Journal of Biological Chemistry.* 276: 15996-16007.
67. **Rep., M., Krantz, M., Thevelin, J. M., and Hohman, S.** (2000). The transcriptional Response of *Saccharomyces cerevisiae* to osmotic shock. *The Journal of Biological Chemistry.* 327 (12): 8290-8300.
68. **O´Rourke, S.M., Herskowitz, I., O´Shea, E.K.** (2002). Yeast go the Whole HOG for the hyperosmotic response. *TRENDS in genetics.* 18: 405-412.
69. **Martínez-Pastor, M.T., Marchler, G., Schüller, C., Marchler-Bauer, A., Ruis, H., and Estruch, F.** (1996). The *Saccharomyces cerevisiae* zinc finger proteins Msn2p y Msn4 are required for transcriptional induction through the stress-response element (STRE). *The EMBO Journal.* 15:2221-2235.
70. **Schimtt, A.P., and McEntee, E** (1996). Msn2p, a zinc finger DNA-binding protein, is the transcriptional activator of multistress response in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 93:5777-5782.

71. **Nadal, E., Casadomé, L., and Posas, F.** (2003). Targeting the MeF2-like transcription factor Smp1 by the stress-activated Hog1 mitogen-activate protein kinase. *Molecular and Cellular Biology*. 23:229-237
72. **Pascual-Ahuir, A., Posas, F., Serrano, R., and Prof, M.** (2001). Multiple levels of control regulate the yeast cAMP-response element binding protein repressor Sko1 in response to stress. *The Journal of Biological Chemistry*. 276:37373-37378.
73. **Proft, M., and Serrano, R.** (1999). Repressors and upstream repressing sequences of the stress-regulated ENA1 gene in *Saccharomyces cerevisiae*: b-ZIP protein Sko1p confers HPG-dependent osmotic regulation. *Molecular and Cellular Biology*, 19:537-546.
74. **Proft, M., and Struhl, K.** (2002). HOG1 kinase converts the Sko1-Cyc8-Tup1 repressor complex into an activator that recruits SAGA and SWI/SNF in response to osmotic stress. *Molecular Cell*. 9:1307-1317.
75. **Rep, M., Reiser, V., Gartner, U., Thevelein, J.M, Hohmann, S., Ammerer, G., and Ruis, H.** (1999). Osmotic stress-induced gene expression in *Saccharomyces cerevisiae* requires Msn1p and the novel nuclear factor Hot1p. *Molecular and Cellular Biology*.19:5474-5485.
76. **Guba, M., P.Von Breitenbuch, M. Steinbauer, G. Koehl, S. Flegel, M.Hornung, C.J. Burns, C. Zuelke, S.Farkas, M. Anthueber, K.W. Jauch, and E.K. Geissler.** 2002. Rapamycin inhibits primary and metastatic tumor growth by antiangiogenesis: involvement of vascular endothelial growth factor. *Nat. Med*. 8: 128-135.

-
-
77. **Hidalgo, M., and Rowinsky, E.K.** (2000). The rapamycin-sensitive signal transduction pathway as a target for cancer therapy. *Oncogene* 19: 6689-6686.
 78. **Raught, B., Gingras, A-C., Sonenberg, N.** (2001). The target of rapamycin (TOR). *Proc. Natl. Acad. Sci.USA.* 98: 7037-7044.
 79. **Crespo, J.L and Michael Hall, M.N.** (2002). Elucidating TOR signaling and rapamycin action: Lessons from *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology and Molecular reviews*, 66:579-591.
 80. **Robert T. Abraham.** (2002). Identification of TOR Signaling complexes: more TORC for the Cell Growth Engine. *Cell.*111: 9-12.
 81. **Jiang, Y., and Broach, J.R.** (1999). Tor proteins and protein phosphatase A reciprocally regulate Tap42 in controlling cell growth in yeast. *EMBO Journal*, 18:2782-2792.
 82. **Cardenas, M., Cutler, S.N., Lorenz, M.C., Di Como, C.J., Heitman, J.** (1999). The TOR signaling cascade regulates gene expression in response to nutrients. *GENES & DEVELOPMENT.* 13:3271-3279.
 83. **Beck, T., and Hall, M.** (1999). The TOR signalling pathways controls nuclear localization of nutrient-regulates transcription factors. *Nature* 402: 689-692.
 84. **Bertram, P.G., Choi, J.H, Carvalhos, J., Ai, W., Zeng, C., Chan, T-F., and Zheng, S.X.F.** (2000). Tripartite regulation of Gln3p by TOR, Ure2p, and phosphatases. *Journal Biological Biochemistry.* 275:35727-35733.

-
-
85. **Shamji, A.F., Kuruvilla, F.G. and Schreiber S.L.** (2000). Partitioning the transcriptional program induced by rapamicina among the effectors of the TOR proteins. *Current Biology*, 10: 1574-1581.
86. **Chaudhri, M., Scarabel, M., and Aitken, A** (2003). Mammalian and yeast 14-3-3 isoforms from distinct patterns of dimmers in vivo. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 300:679-685.
87. **Callejo, M., Alvarez, D., Price, G.B., and Zannis-Hadjopoulos.** (2002). The 14-3-3 protein homologues from *Saccharomyces cerevisiae*, Bmh1p and Bmh2p, have cruciform DNA-binding activity and associate in vivo with ARS307. *The Journal of Biological Chemistry*. 277:38416-38423.
88. **Mayordomo, I., Estruch, F., and Sanz, P.** (2002). Convergence of the target of rapamycin and the Snf1 kinase pathway in the regulation of the subcellular localization of Msn2, a transcriptional activator of STRE (Stress Response Element)-regulated genes. *The Journal of Biological Chemistry* 277 (38), pp. 35650-35656.
89. **Mayordomo, I., et al.** (2003). *Saccharomyces cerevisiae* 14-3-3 proteins Bmh1 and Bmh2 participate in the process of catabolite inactivation of maltose permease. *FEBS Letters* 544, p: 160-164.
90. **Jia, Y., Rothermel, B., Thornton, J. and Butow, R.A.** (1997). A basic helix-loop-helix leucine zipper transcription complex in yeast functions in a signaling pathway from mitochondria to the nucleus. *Molecular and Cellular Biology*. 17, 1110-1117.
91. **Crespo, J.L., Powers, T., Fowler, B., and Hall, M.N.** (2002). The TOR-controlled transcription activators GLN3, RGT1, and RGT3 are

regulated in response to intracellular levels of glutamine. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 99:6784-6789.

92. **Hardwick, J., Kuruvilla, F.G., Tong, J.K., Shamji, F.A, and Schreiber, S.L.** (1999). Rapamycin-modulated transcription defines the subset of nutrient-sensitive signalling pathways directly controlled by the Tor proteins. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 96:14866-14870
93. **Hubbard, E., Jiang, R. Carlson, M.** (1994). Dosage-dependent modulation of glucose repression by MSN3 (STD1) in *Saccharomyces cerevisiae*. Molecular and Cellular Biology.14 : 1972-1978.
94. **Johnston, M., Brachet, V., Polish, J. and Kim, J.-H.** (2001). Glucose sensing and signal transduction. Yeast 18, S25.
95. **Tomás-Cobos, L., and Sanz, P.** (2001) "Active Snf1 protein kinase inhibits expression of the *Saccharomyces cerevisiae* *HXT1* glucose transporter gene". The Biochemical Journal. 368,657-663.
96. **Tomás-Cobos, L., Casadomé, L., Mas, G, Sanz, P., and Posas, F.** (2004). Expression of the *HXT1* Low Affinity Glucose Transporter Requires the Coordinated Activities of the HOG and Glucose Signalling Pathways. The Journal of Biological Chemistry. 279: 22010-22019.