

WENDEL BATISTA DA SILVEIRA

INFLUÊNCIA DO METABOLISMO DE CARBONO E DO NÍVEL DE
OXIGÊNIO SOBRE A LOCALIZAÇÃO DA PERMEASE DE LACTOSE EM
Kluyveromyces lactis

Tese apresentada à Universidade
Federal de Viçosa, como parte
das exigências do Programa de
Pós-Graduação em Microbiologia
Agrícola, para obtenção do título de
Doctor Scientiae.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2007

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

S587i
2007

Silveira, Wendel Batista da, 1979-

Influência do metabolismo de carbono e do nível de oxigênio sobre a localização da permease de lactose em *Kluyveromyces lactis* / Wendel Batista da Silveira.

– Viçosa, MG, 2007.

xi, 88f. : il. (algumas col.) ; 29cm.

Texto em inglês e português.

Orientador: Flávia Maria Lopes Passos.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. *Kluyveromyces lactis*. 2. Leveduras (Fungos) - Fisiologia. 3. Enzimas. 4. Fermentação. 5. Biotecnologia.
I. Universidade Federal de Viçosa. II. Título.

CDD 22.ed. 579.76

WENDEL BATISTA DA SILVEIRA

INFLUÊNCIA DO METABOLISMO DE CARBONO E DO NÍVEL DE
OXIGÊNIO SOBRE A LOCALIZAÇÃO DA PERMEASE DE LACTOSE EM
Kluyveromyces lactis

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

APROVADA: 28 de setembro de 2007.

Prof^a Marisa Vieira de Queiroz
(Co-orientadora)

Prof. Maurício Dutra Costa

Prof. Luciano Gomes Fietto

Prof. Pedro Soares de Araújo

Prof^a Flávia Maria Lopes Passos
(Orientadora)

*Dedico este trabalho à minha esposa,
Marcela, aos meus pais, João e Maria
das Graças, e ao meu irmão, Diego.*

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Viçosa, em especial ao Departamento de Microbiologia, pela oportunidade de realização do doutorado.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), e ao Serviço de Intercâmbio Alemão (DAAD), pela oportunidade e pelo financiamento do doutorado “sanduíche” na Alemanha.

À Martin Luther Universität Halle-Wittenberg, Alemanha, em especial ao Departamento de Genética, pela acolhida.

À Professora Flávia Maria Lopes Passos, pelo apoio e pela orientação durante a realização deste trabalho.

À Professora Karin Breunig, pela orientação e pela oportunidade de realização de parte dos experimentos deste trabalho em seu laboratório.

Aos Professores Hilário Cuquetto Mantovani e Marisa Vieira de Queiroz, pelas valiosas sugestões, pelos ensinamentos e pelos conselhos.

A todos os professores, funcionários e colegas do Departamento de Microbiologia da Universidade Federal de Viçosa, Brasil, e do Departamento de Genética da Martin Luther Universität Halle-Wittenberg, pela colaboração e pela convivência agradável.

A todas as pessoas que, de alguma forma, contribuíram para que este trabalho se realizasse.

BIOGRAFIA

WENDEL BATISTA DA SILVEIRA, filho de João Batista da Silveira e Maria das Graças Raimundo da Silveira, nasceu em Visconde do Rio Branco, Minas Gerais, no dia 21 de setembro de 1979.

Em março de 1998, ingressou no curso de Ciência e Tecnologia de Laticínios da Universidade Federal de Viçosa (UFV), bacharelando-se em Ciência e Tecnologia de Laticínios em maio de 2002.

Em setembro de 2002, iniciou o Programa de Pós-Graduação, em nível de Mestrado, em Microbiologia Agrícola da UFV, com término em fevereiro de 2004.

Em março de 2004, ingressou no Programa de Pós-Graduação, em nível de Doutorado em Microbiologia Agrícola da UFV, submetendo-se à defesa de tese em 28 de setembro de 2007.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO	viii
ABSTRACT	x
1. INTRODUÇÃO	1
CAPÍTULO 1	3
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1. Características fisiológicas de <i>K. lactis</i> e seu potencial biotecnológico.....	3
2.2. Regulação da transcrição dos transportadores de glicose em leveduras	5
2.3. Regulação da via de repressão por glicose em leveduras.....	8
2.4. Regulação da transcrição de genes do metabolismo de lactose e galactose em leveduras.....	14
2.5. Regulação pós-traducional de transportadores em leveduras .	16
2.6. Influência da concentração de oxigênio no transporte de açúcares em leveduras.....	24
REFERÊNCIAS	28
CAPÍTULO 2.....	44

	Página
Influence of carbon source, oxygen level and <i>snf1</i> mutation on the subcellular localization of Lac12GFP permease in <i>Kluyveromyces lactis</i>	44
ABSTRACT.....	44
1. INTRODUCTION	46
2. MATERIAL AND METHODS.....	49
2.1. Strains and growth conditions.....	49
2.2. Construction of the pCAL12EGFP plasmid.....	50
2.3. Fluorescence microscopy analysis	50
2.4. Northern analysis	51
2.5. Analysis of sugar consumption and ethanol production	51
3. RESULTS	52
3.1. <i>K. lactis</i> has a higher affinity for lactose than for glucose	52
3.2. Glucose does not affect the KISnf1p activity that is involved with the subcelular localization of LAC12GFP permease	54
3.3. LAC12GFP permease is localized around vacuole when <i>K. lactis</i> is grown overnight on lactose	54
3.4. The subcelular localization of LAC12GFP permease is similar on both galactose and glucose	55
3.5. LAC12GFPp is predominantly localized at vacuole membrane in <i>KISnf1</i> mutant.....	57
3.6. KISnf1p markedly influences the <i>LAC12GFP</i> gene expression only at post-translational level.....	58
3.7. The oxygen level has a pronounced effect on LAC12GFPp localization	59
5. DISCUSSION.....	61
6. REFERENCES	65
CAPÍTULO 3.....	69
Isolation of mutants able to suppress the lactose toxicity in <i>K. lactis lac4Δ</i>	69
ABSTRACT.....	69
1. INTRODUCTION	71

	Página
2. MATERIAL AND METHODS.....	73
2.1. Strains and growth media	73
2.2. Plasmids and Sequencing.....	74
2.3. Fluorescence microscopy analysis	74
3. RESULTS	75
3.1. Multicopy suppression.....	75
3.2. The supression of lactose toxicity is due to a spontaneous mutation	77
3.3. Growth on lactose is not impaired in the WBS308 and WBS312 strains	79
3.4. The Lac12GFPP intracellular distribution is not changed by spontaneous mutation in WBS308 and WBS312 strains	80
4. DISCUSSION.....	82
5. REFERENCE.....	84
CONCLUSÕES.....	86

RESUMO

SILVEIRA, Wendel Batista, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, setembro de 2007. **Influência do metabolismo de carbono e do nível de oxigênio sobre a localização da permease de lactose em *Kluyveromyces lactis***. Orientadora: Flávia Maria Lopes Passos. Co-Orientadores: Marisa Vieira de Queiroz e Hilário Cuquetto Mantovani

Neste trabalho foi analisada a influência da fonte de carbono e do nível de oxigênio sobre a localização da permease Lac12GFP na levedura *Kluyveromyces lactis*. Inicialmente, foi mostrado que *K. lactis* apresenta afinidade maior para lactose do que para glicose. Os dados indicaram que a localização da permease Lac12GFP dependente da KISnf1p não foi afetada pela presença de glicose. A localização dessa permease foi similar quando *K. lactis* foi cultivada em galactose e glicose, mas diferente quando cultivada em lactose. Os níveis de mRNA do gene *LAC12GFP* expressos a partir do promotor ADH1, que não está sob a influência da KISnf1p, foram similares entre a linhagem selvagem e o mutante *Klsnf1*. Esse resultado mostra que a influência da KISnf1p sobre a expressão do gene *LAC12GFP* é exercida marcadamente somente em nível pós-traducional. A análise da localização subcelular da permease de lactose no mutante *Klsnf1* evidenciou que a permease é encontrada na membrana do vacúolo, sugerindo que Klsnf1p pode estar envolvida com a translocação da permease para dentro

do vacúolo. Em condições hipóxicas, até 3 h de crescimento, foi observado aumento do sinal da permease de lactose na membrana plasmática, em comparação com as condições normóxicas. Na tentativa de isolar reguladores negativos do transporte de lactose em *K. lactis*, realizou-se uma triagem genética (supressão multicópia). A supressão multicópia foi utilizada para selecionar transformantes capazes de suprimir a toxicidade da lactose observada no mutante *Kllac4* cultivado em meio mínimo contendo lactose e glicerol como fontes de carbono. Entre os 68 plasmídeos recuperados do mutante *Kllac4* transformado com uma biblioteca genômica, nove apresentaram tamanho maior que o do vetor vazio (Kep6). Contudo, os dados deste estudo indicam que a supressão foi devida a uma mutação espontânea. Nesses mutantes, o transporte de lactose não foi prejudicado.

ABSTRACT

SILVEIRA, Wendel Batista, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, September of 2007. **Influence of carbon metabolism and oxygen level on lactose permease localization in *Kluyveromyces lactis***. Adviser: Flávia Maria Lopes Passos. Co-Advisers: Marisa Vieira de Queiroz and Hilário Cuquetto Mantovani.

In this work we analyzed the influence of the carbon source, oxygen level and *snf1* mutation on the subcellular localization of Lac12GFP permease in the yeast *Kluyveromyces lactis*. Initially we showed that *K. lactis* has higher affinity for lactose than for glucose. Our data suggest that the KISnf1p dependent subcellular localization of Lac12GFP permease was not affected by glucose. Furthermore, we observed that the subcellular localization of this permease was similar when *K. lactis* was grown on galactose and glucose, but different on lactose. The mRNA levels of the *LAC12GFP* gene expressed from KISnf1p independent promoter were similar between the wild type and *Klsnf1* mutant, indicating that KISnf1p markedly affects the *LAC12GFP* gene expression only at post-translational level. Analysis of the subcellular localization of lactose permease in *Klsnf1* mutant showed that the permease is found intracellularly at the vacuole membrane, suggesting that KISnf1p may be involved with the lactose permease translocation into vacuole. In hypoxic condition, more lactose permease was

localized at plasma membrane up to 3 hours of growth, indicating that the oxygen availability influences the localization of Lac12GFPp. Furthermore, we performed a screening (multicopy suppression) to identify negative regulators of lactose uptake in *K. lactis*. The multicopy suppression was used to select transformants able to suppress lactose toxicity, because lactose is toxic for *Kllac4* mutant grown on minimal medium containing lactose plus glycerol as a carbon source. Among the 68 plasmids rescued from WBS1 (*lac4* mutant) transformed with a Kep6-based genomic plasmid library (multicopy suppression), nine were bigger than Kep6 (empty vector). Nevertheless, our data showed that the suppression was due to a spontaneous mutation. In these mutants the lactose uptake was not impaired.

1. INTRODUÇÃO

A levedura do leite *Kluyveromyces lactis* se destaca tanto por suas propriedades biotecnológicas, como pela produção da enzima β -galactosidase e de proteínas heterólogas, quanto pela regulação do metabolismo de carbono em contraste com a regulação da tradicional levedura da fermentação alcoólica *Saccharomyces cerevisiae*.

O potencial biotecnológico de *K. lactis* é devido, principalmente à sua capacidade de fermentar o soro de queijo, subproduto da indústria de laticínios resultante da precipitação e remoção da caseína do leite durante a produção de queijos. A utilização do soro de queijo como meio de fermentação é interessante tanto do ponto de vista econômico, por ser um substrato geralmente descartado pelas indústrias de leite, quanto do ponto de vista ambiental, visto que o descarte do soro de queijo no ambiente sem tratamento gera graves problemas ambientais, oriundos da alta demanda bioquímica de oxigênio para degradação do soro. Procura-se uma alternativa na qual o tratamento do soro de queijo seja acoplado à obtenção de um produto de interesse comercial, como por exemplo, a produção de proteínas heterólogas e de etanol pela fermentação do soro de queijo por *K. lactis*.

Enquanto *S. cerevisiae* é uma levedura Crabtree positiva, ou seja, cresce à custa do metabolismo fermentativo em condições aeróbicas sobre altas concentrações de glicose (De DEKEN, 1966), *K. lactis* cresce nessas condições utilizando tanto a via fermentativa quanto a via respiratória, sendo

classificada como uma levedura respirofermentativa. Além disso, *S. cerevisiae* é mais sensível à repressão por glicose do que *K. lactis*. A repressão por glicose em *K. lactis* é dependente da linhagem, visto que em algumas linhagens existe leve efeito de repressão por glicose, enquanto em outras linhagens a repressão por glicose é completamente ausente. Outra diferença importante entre *K. lactis* e *S. cerevisiae* diz respeito ao espectro da utilização de substrato, pois *K. lactis* é capaz de assimilar lactose, açúcar encontrado na natureza somente no leite e derivados, enquanto *S. cerevisiae* não o é.

Os mecanismos de sinalização e de regulação da expressão do gene *LAC12*, cujo produto é a permease de lactose (Lac12p), em nível transcricional são bem compreendidos. Entretanto, informações a respeito dos mecanismos de sinalização e de regulação em nível pós-transcricional e pós-traducional da permease Lac12p são escassas. Para o nosso conhecimento existe apenas um relato sobre estudos de localização subcelular da permease Lac12p. Neste trabalho foi demonstrado que a mutação no gene *SNF1* que codifica a serina/treonina cinase KISnf1p resultou em uma pronunciada localização da permease em compartimentos intracelulares, em comparação com a linhagem selvagem. Esses resultados indicam que a proteína Snf1p tem efeito marcante sobre a localização subcelular da permease Lac12p, porém o seu papel é ainda desconhecido.

Em leveduras, a regulação do transporte de açúcares é fator-chave na regulação do fluxo fermentativo. Nos últimos anos, alguns experimentos evidenciam que a concentração de oxigênio apresenta forte efeito no transporte de açúcares em leveduras. Na levedura *Kluyveromyces marxianus*, tanto a velocidade de transporte de lactose quanto a velocidade de produção de etanol são maiores em baixas concentrações de oxigênio (hipoxia).

Esse trabalho propõe investigar o efeito da mutação *Klsnf1*, da fonte de carbono e do nível de oxigênio sobre a localização subcelular da permease de lactose em *K. lactis*. Além disso, neste trabalho propôs-se a realização de triagem genética utilizando supressão multicópia para isolar reguladores negativos do transporte de lactose.

CAPÍTULO 1

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Características fisiológicas de *K. lactis* e seu potencial biotecnológico

A levedura do leite *Kluyveromyces lactis* (*K. lactis*) é uma das poucas leveduras na natureza capaz de assimilar lactose, açúcar somente encontrado no leite e derivados. Assim, *K. lactis* apresenta grande potencial para fermentação do soro de queijo, subproduto da indústria de laticínios resultante da precipitação e remoção da caseína do leite durante a produção de queijos (KOSIKOWSKI, 1979). A produção mundial de soro de queijo vem aumentando com o impulso da indústria de laticínios (DALLAS; LAGRANGE, 1998). O soro de queijo é, na maioria das vezes, tratado como um resíduo inútil ou utilizado na alimentação de animais em fazendas (KOURKOUTAS et al., 2002). Quando é descartado em mananciais sem tratamento prévio, esse resíduo causa graves problemas ambientais em razão, principalmente, da lactose, o fator responsável pelas altas demandas bioquímica e química de oxigênio (MAWSON, 1994). Nos últimos anos, a legislação que trata da qualidade do efluente da indústria de laticínios tornou-se mais rigorosa com relação ao destino do soro de queijo, na tentativa de preservar o meio ambiente, porém, boa parte do soro produzido ainda é descartada na

natureza como resíduo inútil (SIEKIEWICZ; RIEDEL, 1990, citados por SISO, 1996).

Dentre os produtos de interesse comercial obtidos pela fermentação de soro de queijo pela *K. lactis*, destaca-se a produção da enzima β -galactosidase, biomassa e proteínas heterólogas e metabólitos, a exemplo do etanol.

K. lactis é aprovada como organismo seguro pelo FDA e, portanto, pode ser empregada para produção de proteínas de interesse da indústria de alimentos ou farmacêutica (BONEKAMP; OSTERON, 1994). A enzima β -galactosidase catalisa a hidrólise do açúcar lactose aos monômeros glicose e galactose, apresentando aplicações no processamento de leite com baixo teor de lactose e de produtos desidratados, nos quais o açúcar lactose leva à formação indesejável de cristais (BONEKAMP; OSTERON, 1994).

K. lactis vem recebendo crescente atenção por apresentar propriedades atrativas para secreção de proteínas heterólogas. Algumas dessas propriedades incluem, além do *status* de organismo reconhecido como seguro para a saúde do consumidor, a acessibilidade de técnicas moleculares utilizando sistemas de vetores integrativos e replicativos altamente especializados e características fermentativas desejáveis como alto rendimento de biomassa. Outro aspecto interessante é a capacidade de exportar o complexo “killer” zimocina que possui alto peso molecular, indicando que *K. lactis* é levedura apropriada para secretar proteínas de alto peso molecular. A via de secreção em *K. lactis* favorece o processamento de proteínas heterólogas pelo baixo grau de glicosilação, reduzindo riscos de imunogenicidade em proteínas terapêuticas. De fato, o potencial de *K. lactis* de secretar proteínas foi confirmado em uma série de estudos de expressão e secreção com as mesmas proteínas em *K. lactis* e *S. cerevisiae*. Em *K. lactis*, os rendimentos e a eficiência de secreção foram superiores aos apresentados por *S. cerevisiae*. As informações citadas acima foram revisadas por Schaffrat e Breunig (2000).

Diante da crescente demanda para a produção de fontes renováveis e limpas de combustível, a produção de álcool a partir de soro de queijo já vem sendo utilizada em alguns países (RAPIN et al., 1994). Algumas destilarias produtoras de álcool, a partir de soro de queijo, estão em operação comercial na Irlanda, nos Estados Unidos e, principalmente, na

Nova Zelândia, onde um quinto do soro de queijo é utilizado para produzir etanol (MAWSON, 1994).

Associada à importância biotecnológica, *K. lactis* chama a atenção por apresentar a regulação do metabolismo de carbono e energia distinta à regulação da tradicional levedura da fermentação alcoólica *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*) (BREUNIG; SCHAFFRAT, 2000; BREUNIG et al., 2000). Enquanto *S. cerevisiae* é classificada como uma levedura Crabtree positiva, ou seja, cresce à custa do metabolismo fermentativo em condições aeróbicas sobre altas concentrações de glicose (De DEKEN, 1966), *K. lactis* cresce nessas condições utilizando tanto a via fermentativa quanto a via respiratória, sendo classificada como uma levedura respirofermentativa (SISO et al., 1996; SISO et al., 2000). O espectro de utilização de substratos de *K. lactis* é maior do que o de *S. cerevisiae*. Lactose é um dos açúcares que podem ser metabolizados por *K. lactis*, mas não por *S. cerevisiae* (WÉSOŁOWSKI et al., 1996). Outra diferença marcante entre *K. lactis* e *S. cerevisiae* diz respeito à suscetibilidade à repressão por glicose. A repressão por glicose da expressão de genes de fontes de carbono alternativa à glicose é significativamente menor em *K. lactis* quando comparada com a repressão em *S. cerevisiae*. Em algumas linhagens de *K. lactis*, a repressão por glicose é ausente (BREUNIG et al., 2000; BARUFFINI et al., 2006).

2.2. Regulação da transcrição dos transportadores de glicose em leveduras

O metabolismo central de carbono em leveduras é conservado em diferentes espécies, mas com estratégias de regulação diferentes (FLORES et al., 2000). Leveduras empregam sofisticadas estratégias regulatórias para adaptar seu metabolismo de carbono à disponibilidade de açúcares, sendo o transporte de açúcar o primeiro alvo da regulação (MILKOWSKI et al., 2001).

A levedura *S. cerevisiae* é capaz de monitorar a concentração extracelular de glicose por meio de sensores presentes na membrana plasmática e transmitir o sinal para o citoplasma (JONHSTON, 1999; ROLLAND et al., 2000). O monitoramento da concentração de glicose no ambiente é realizado por dois tipos de sensores presentes na membrana, os quais atuam em vias distintas (KIN; JOHNSTON, 2006). Esses sensores de

glicose, Snf3p e Rgt2p, são membros da família de transportadores de hexose, entretanto eles não possuem atividade de transporte, mas atuam na regulação da expressão de transportadores de hexose (LIANG; GABER, 1996; REIFENBERGER et al., 1995). Os sensores Snf3p e Rgt2p possuem uma longa cauda C-terminal citoplasmática ausente nos carreadores de glicose (CELENZA et al., 1988). É proposto que essa cauda C-terminal é responsável pela transmissão do sinal à maquinaria de transcrição (OZCAN et al., 1998; VAGNOLI et al., 1998).

O sensor Snf3p atua como sensor de alta afinidade por glicose, sendo requerido para a indução de genes que codificam transportadores de hexose de alta afinidade, como *HXT2*, *HXT3* e *HXT4* (OZCAN; JOHNSTON, 1995). A Rgt2p funciona como um sensor de baixa afinidade por glicose, sendo requerida na indução da expressão do gene *HXT1*, que codifica um transportador de baixa afinidade por glicose (OZCAN et al., 1996).

Os sensores transmitem o sinal para as proteínas Std1 e Mth1, que agem em vias distintas. A Std1p atua em uma via dependente da serina/treonina cinase Snf1p, enquanto a Mth1p atua de maneira independente da Snf1p. A Std1p é requerida na desrepressão de genes que codificam transportadores de hexose de alta afinidade, bem como na expressão e repressão do gene *HXT1*, que codifica o transportador de baixa afinidade (SCHMIDT et al., 1999). A Mth1p atua na repressão de genes que codificam tanto transportadores de hexose de alta afinidade quanto transportadores de hexose de baixa afinidade (LAFUENTE; SCHULTE et al., 2000). O principal alvo da via de sinalização Snf3p/Rgt2p é o repressor transcricional de genes que codificam transportadores de hexose Rgt1p (LAFUENTE; SCHULTE et al., 2000).

O outro tipo de sensor (Gpr1p), acoplado à proteína G (Gpa2p), é requerido para ativação da via da proteína cinase A dependente de cAMP, a qual está envolvida com a resposta a estresse (KRAAKMAN et al., 1999; ROLLAND et al., 2000; VERSELE et al., 1999). Recentemente, foi demonstrado que a proteína cinase A regula a atividade do repressor Rgt1p, portanto as duas vias de sensores de glicose convergem para esse repressor e, conseqüentemente, regulam a expressão dos transportadores de hexose (KIM; JOHNSTON, 2006).

A levedura *K. lactis* também é capaz de monitorar a concentração de glicose, mas os mecanismos são menos compreendidos do que em *S. cerevisiae*. Em *K. lactis* JA6, o transporte de glicose é mediado por dois transportadores (Kht1p e Kht2p) semelhantes aos transportadores de hexose em *S. cerevisiae*. Em *K. lactis* CBS2359 existem dois transportadores de glicose: Rag1p de baixa afinidade e Hgt1p de alta afinidade. A regulação do transportador de baixa afinidade (Kht1p) é muito semelhante à regulação do transportador de baixa afinidade Rag1p (MILKOWSKI et al., 2001). De fato, o gene *KHT1* tem quase a mesma seqüência do gene *RAG1*, exceto uma pequena diferença na extremidade 3'. Tanto Kht1p quanto Rag1p são fortemente induzidos na presença de glicose. Já a regulação do Kht2p é mais complexa do que nos transportadores Kht1p e Rag1p. O Kht2p é induzido duas vezes mais do que o nível basal em glicose 0,1% (5 mM) e muito fracamente induzido em glicose 2% (p/v). Além disso, esse transportador é altamente induzido por glicerol (MILKOWSKI et al., 2001). A regulação de *KHT2* assemelha-se à dos genes *HXT6/7* em *S. cerevisiae* (BOLES; HOLLENBERG, 1997; LIANG; GABER, 1996). Interessantemente, a expressão de *HGT1* ocorre constitutivamente (BILLARD et al., 1996). Milkowski et al. (2001) propuseram que a atividade de transporte de Kht1p e Kht2p influencia a regulação, em nível transcricional desses, e que o monitoramento da concentração de glicose ocorreria intracelularmente, ou seja, em *K. lactis* JA6 não existe um sensor extracelular na membrana. Entretanto, Betina et al. (2001) relataram que em *K. lactis* CBS2359 o gene *RAG4*, que codifica uma proteína homóloga aos sensores de glicose de *S. cerevisiae* Snf3p e Rgt2p, apresenta função dupla no monitoramento e sinalização de altas e baixas concentrações de glicose. Além disso, a expressão do transportador de glicose Rag1p é controlada pela Rag4p, semelhante ao papel desempenhado pelos sensores Snf3p e Rgt2p em *S. cerevisiae*. A via de sinalização de Rag4p, semelhante à via de sinalização Snf3p e Rgt2p, tem como alvo o repressor Rgt1p. O sensor Rag4p em cooperação com a Rag8p (proteína semelhante a caseína cinase I) inativa o repressor KIRgt1p em resposta a altas concentrações de glicose, conduzindo a desrepressão do gene *RAG1* (ROLLAND et al., 2006).

2.3. Regulação da via de repressão por glicose em leveduras

Em *S. cerevisiae*, as vias de sinalização por glicose são controladas intracelularmente por uma série de fatores de transcrição e proteínas reguladoras, dentre as quais se podem destacar a hexocinase ScHxk2p, a heterotrimérica serina/treonina cinase ScSnf1p, o complexo fosfatase (Reg1/Glc7p) e o repressor transcricional ScMig1p (GANCEDO, 1998; MORIYA; JOHNSTON, 2004).

S. cerevisiae possui três genes que codificam glicose cinases (*ScHXK1*, *ScHXK2* e *ScGLK1*), porém somente a hexocinase ScHxk2p pode mediar a repressão por glicose de genes envolvidos na utilização de fontes de carbono alternativas (De WINDE et al., 1996; HOHMANN et al., 1999). Além da reconhecida atividade catalítica da ScHXK2p na primeira reação da via glicolítica, ela apresenta também uma função importante no controle da expressão de genes do metabolismo de carbono (MORENO; HERRERO, 2002). A transmissão de sinais induzidas por altas concentrações de glicose resulta na predominância da ScHxk2p, enquanto fontes de carbono não-fermentáveis ou galactose levam à predominância de ScHxk1p e ScGlc1p. De fato, baixas concentrações de glicose reprimem a expressão do gene *HXK2* por intermédio do repressor Rgt1p dependente da cinase Snf1p (PALOMINO et al., 2006). Condições limitantes de glicose estimulam *in vivo* a fosforilação da Hxk2p no resíduo de serina 14, levando à dissociação *in vitro* dela do estado homodimérico para o monomérico (KRIEGEL et al., 1994; RANDEZ-GIL et al., 1998). Na forma monomérica, a ScHxk2p tem maior afinidade por glicose e é inibida por concentrações de ATP encontradas na célula (GOLBIK et al., 2001). Além disso, a Hxk2p autofosforila o resíduo de serina 156 *in vitro* quando análogos de glicose não-fosforilados estão presentes, levando à perda reversível de sua atividade, bem como a desrepressão da transcrição de genes de fontes de carbono alternativa (HEIDRICH et al., 1997; KRAAKMAN^b et al., 1999). O papel da ScHxk2p no mecanismo de repressão por glicose é ainda pouco entendido. Nehlin e Ronne (1990) e Entian et al. (1977) relataram que as proteínas Hxk2 e Mig1 participariam na via de repressão por glicose como repressores. Randez-Gil et al. (1998) e Herrero et al. (1998) demonstraram

que aproximadamente 15% da hexocinase ScHXK2p são localizadas no núcleo. Essa localização é requerida para repressão dos genes *SUC2*, *HXK1* e *GLK1*, que codificam as enzimas invertase, hexocinase 1 e glicose cinase, respectivamente (HERRERO et al., 1998; RODRÍGUES et al., 2001). A hexocinase Hxk2 interage especificamente com o repressor transcricional Mig1 *in vivo* e *in vitro*. O decapeptídeo Lis6-Met15 na Hxk2p é essencial para sua interação com a Mig1p, bem como para a localização nuclear regulada por glicose (AHUATZI et al., 2004). Outro papel da Hxk2p na via de repressão por glicose parece ser a estimulação do complexo fosfatase (Reg1/Glc7p), que uma vez ativado desfosforila a cinase Snf1p, resultando na sua inativação (Johnston 1999).

Em *K. lactis*, a única hexocinase (Rag5p) é requerida na regulação do transporte de glicose, entretanto não existem informações do seu envolvimento na via de repressão por glicose (PRIOR et al., 1993; BÄR et al., 2003). Bär et al. (2003) propuseram que a Rag5p apresenta um equilíbrio homodímero-monômero em condições de catálise e que a fosforilação da cinase controla a formação e dissociação dos dímeros.

Outro componente importante na via de repressão por glicose é a cinase Snf1p. Essa cinase é um membro da família de proteínas ativadas por AMP. A Snf1p é uma proteína heterotrimérica composta pelas subunidades Snf1(α), Snf4 (γ) e Gal83, Sip1 e Sip2 (subunidades β). As subunidades Snf1 e Snf4 estão envolvidas na regulação catalítica, enquanto as subunidades β estão envolvidas na regulação da distribuição celular da Snf1p. Aparentemente, múltiplos mecanismos estão envolvidos tanto na regulação catalítica da Snf1p quanto na regulação da distribuição celular (HEDBACKER; CARLSON, 2006). As cinases Sak1p (Pak1p), Tos3p e Elm1p fosforilam a subunidade catalítica da Snf1p, levando à sua ativação (Figura 1). Além disso, essas três cinases também inibem a proteína fosfatase I (Glc7p) por fosforilação (Figura 1), que uma vez inativada não inibe a atividade da Snf1p (HONG et al., 2003; NATH et al., 2003; SUTHERLAND et al., 2003).

Os mecanismos de sinalização não são ainda totalmente entendidos, mas, ao contrário do que se postulou anteriormente (WILSON et al., 1996), o AMP não tem papel importante (HEDBACKER; CARLSON, 2006).

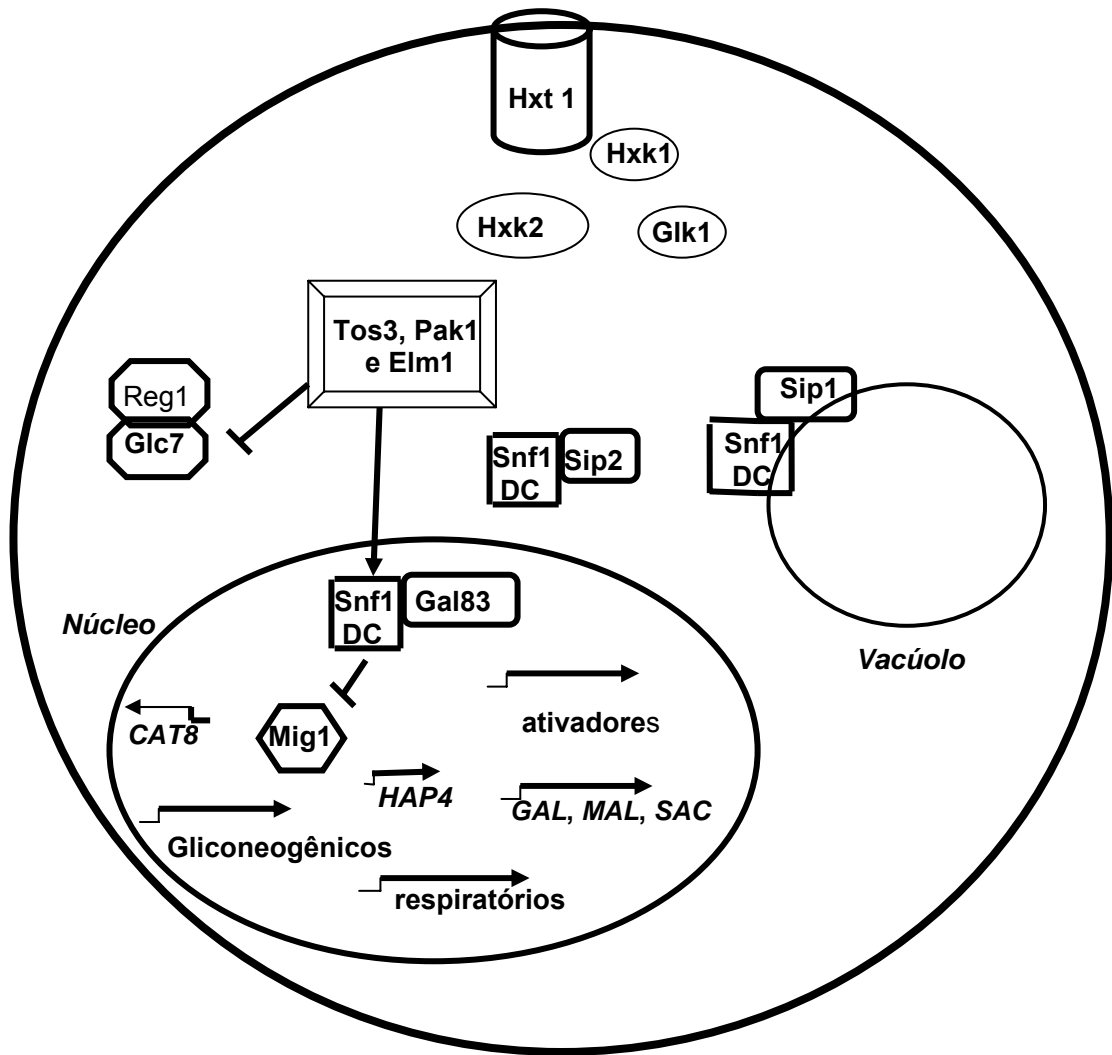


Figura 1 – Regulação da via de repressão por glicose em *Saccharomyces cerevisiae* em presença de fontes de carbono não fermentáveis.

A localização subcelular da Snf1p também é regulada e dependente das subunidades β . Durante o crescimento exponencial em glicose, a Snf1p e todas as subunidades β são localizadas no citoplasma (Figura 2). Em baixas concentrações de glicose ou crescimento sobre fontes de carbono não-fermentáveis, a Snf1p contendo Gal83p, referida como Snf1-Gal83p, acumula no núcleo; a Snf1p contendo Sip1, referida como Snf1-Sip1, localiza na membrana do vacúolo; e a Snf1p contendo Sip2, referida como Snf1-Sip2, permanece no citoplasma (Figura1) (VINCENT et al., 2001). A subunidade Snf4 é encontrada tanto no núcleo quanto no citoplasma, independentemente se as células são crescidas em altas ou baixas concentrações de glicose (VINCENT et al., 2001). As subunidades β

possuem uma seqüência C-terminal conservada, que interage com as subunidades Snf1 e Snf4, porém os N-terminais são divergentes (JIANG; CARLOS, 1997). No caso da subunidade Sip1, o N-terminal confere a localização da proteína na membrana do vacúolo (HEDBACKER^b et al., 2004). A regulação da localização da Sip1p, mas não da Gal83p, tem o envolvimento de outra via de sinalização de glicose, uma vez que a proteína cinase A atua no controle da localização da Sip1p (HEDBACKER^b et al., 2004). O papel da cinase Snf1p na membrana do vacúolo ainda não é conhecido (HEDBACKER^b et al., 2004).

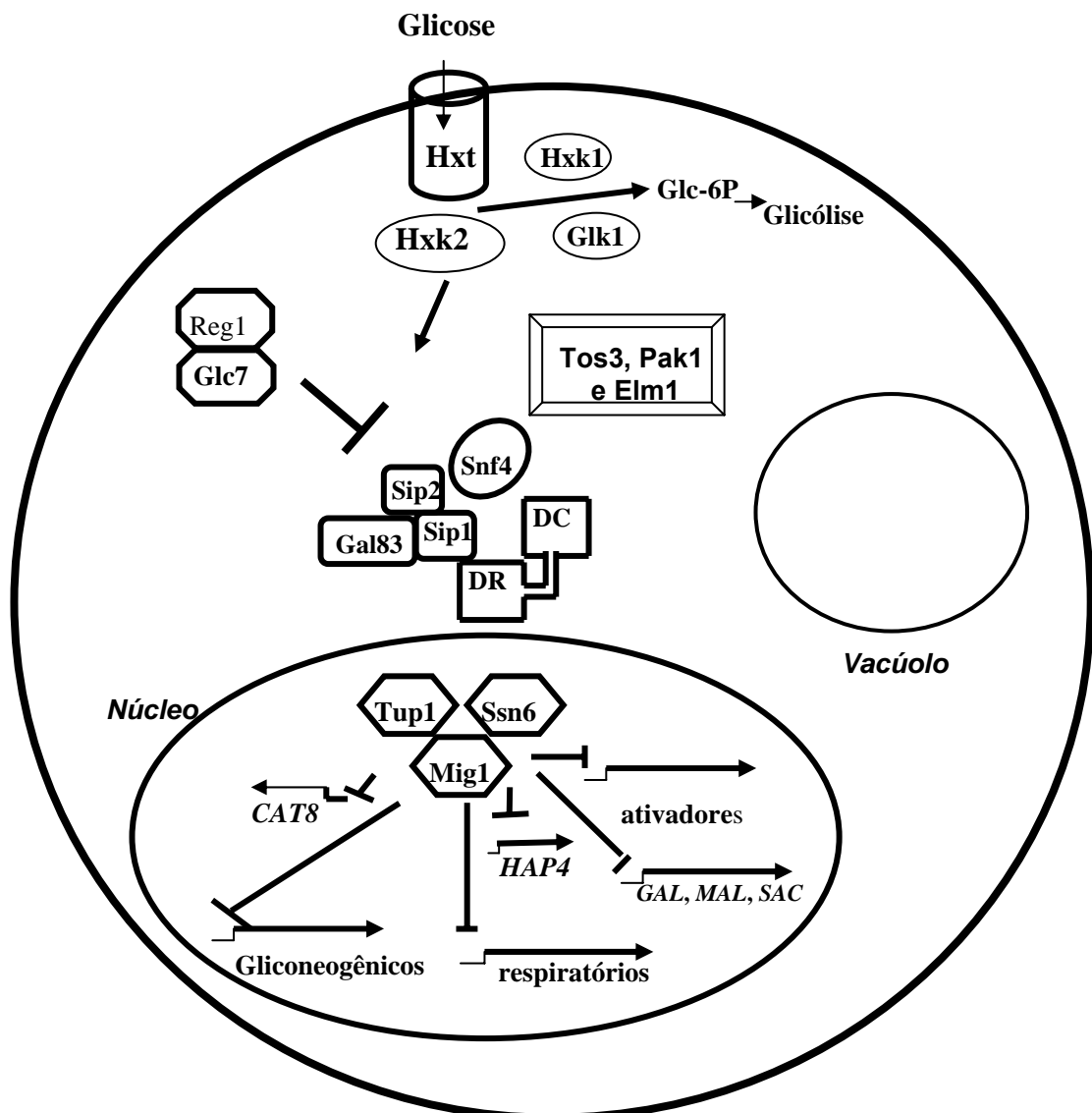


Figura 2 – Regulação da via de repressão por glicose em *Saccharomyces cerevisiae* em presença de glicose.

A regulação da localização da Snf1-Gal83p no núcleo é de especial interesse, pois esta cinase desempenha papéis importantes na regulação do controle transcricional em resposta à limitação por glicose (HEDBACKER; CARLSON, 2006). A ativação da subunidade Snf1p é requerida para a localização de Snf1-Gal83p no núcleo. A ativação de Snf1p, dependente da fosforilação do seu resíduo treonina 210 pela cinase Sak1, é essencial para a localização de Snf1-Gal83p no núcleo, porém o mecanismo pelo qual a atividade da subunidade Snf1 regula a localização é desconhecido (HEDBACKER et al., 2004). Além disso, na ausência da subunidade Snf1 a subunidade Gal83 é capaz de localizar no núcleo independentemente do papel de Sak1, indicando que um mecanismo independente de Snf1-Sak1 também regula a localização de Snf1-Gal83p no núcleo (HEDBACKER et al., 2004). A interação da forma inativa da subunidade Snf1 com o domínio C-terminal da subunidade Gal83p é suficiente para manter a última no citoplasma em células crescidas exponencialmente em glicose (HEDBACKER; CARLSON, 2006). A seqüência N-terminal da subunidade Gal83 é necessária para a regulação da sua localização, independentemente da subunidade Snf1p. Essa seqüência possui um sinal de exportação nuclear rico em leucina (resíduos 39-48), que é requerido para a exclusão nuclear da Gal83p, de maneira independente da subunidade Snf1p. A exclusão dessa subunidade do núcleo é mediada pelo receptor de exportação Crm1p (HEDBACKER; CARLSON, 2006). Ainda não foi identificado na região N-terminal um sinal para importação nuclear da Gal83p (HEDBACKER; CARLSON, 2006).

A cinase Snf1p afeta a expressão de uma rede de genes por regular fatores de transcrição (YOUNG et al., 2003; TREITEL et al., 1998; VINCENT; CARLSON, 1999), fosforilar o resíduo de treonina 10 da histona 3 (LIN et al., 2003) e interagir com a proteína mediadora Srb2 da holoenzima RNA polimerase II (KUCHIN et al., 2000).

Dentre os mecanismos de regulação da atividade de fatores transcricionais pela Snf1p, o mecanismo de regulação do repressor transcricional Mig1p é o mais conhecido. Em *S. cerevisiae*, a Mig1p é o repressor da principal via de repressão por glicose. O repressor Mig1 tem como alvo a região reguladora de genes que codificam enzimas envolvidas

na utilização de fontes de carbono alternativas a glicose, como por exemplo, galactose, maltose, sacarose, glicerol e etanol. A Mig1p contém dois dedos de zinco na região aminoterminal do tipo Cys₂His₂ e liga-se a uma seqüência core rica em GC presente nas regiões reguladoras dos genes-alvo, recrutando os fatores gerais de repressão Ssn6p e Tup1p. (JONHSTON, 1999). O domínio C-terminal, também chamado de domínio efetor, media a interação com o fator geral de repressão Ssn6p. Esse pequeno domínio C-terminal em Mig1p compreende pelo menos 24 resíduos de aminoácidos que são necessários para mediar a repressão por glicose. Esse domínio em *S. cerevisiae* é conservado em *K. lactis*. Os 10 primeiros resíduos do domínio efetor têm carga negativa e apresenta alta probabilidade de formar α -hélice, mas a parte C-terminal deste domínio apresenta algumas hélices quebradas pelo resíduo de prolina. Os resíduos de prolina são organizados em repetições do dipeptídeo leucina-prolina (RSLPLPSP) (OSTLING et al., 1996).

A cinase Snf1 fosforila quatro resíduos de serina localizados nas posições 222, 278, 311 e 381, dos quais três compartilham a seqüência consenso do motivo pelo qual Snf1p reconhece a Mig1p. A fosforilação dos resíduos de serina do repressor Mig1p é o sinal para que a exportina nuclear (Msn5p) reconheça o repressor e efetue sua translocação para o citoplasma, resultando na desrepressão dos genes controlados pela Mig1p (DeVIT; Johnston 1999, TREITEL et al., 1998). Além de regular negativamente o repressor transcricional Mig1, a Snf1p regula positivamente a atividade dos ativadores transcricionais Cat8p e Sip4p, os quais estão envolvidos na ativação de genes gliconeogênicos e do ciclo do glioxilato (RAHNER et al., 1999; VINCENT; CARLSON, 1998).

Homólogos aos componentes centrais da via de repressão por glicose em *S. cerevisiae* são encontrados em *K. lactis*. A KISnf1p (Fog2p), as subunidades β (Fog1p), a KIMig1p e a KICat8p. *FOG1* é um gene homólogo aos genes membros das subunidades β de proteínas *GAL83*, *SIP1* and *SIP2* (GOFFRINI et al., 1996). Embora os componentes da via de sinalização por glicose sejam similares entre *S. cerevisiae* e *K. lactis*, existem grandes diferenças na regulação do metabolismo de carbono e energia. Por exemplo, genes gliconeogênicos e de degradação de sacarose

como inulinase são sujeitos à repressão por glicose, embora nem KICat8p e KIMig1p estejam envolvidos (CASSART et al., 1995, GEORIS et al., 2000). Além disso, o papel da Mig1p na repressão por glicose em *S. cerevisiae* é muito mais efetivo do que em *K. lactis*, visto que a mutação *mig1* em *K. lactis* tem menor influência sobre a expressão dos genes envolvidos no metabolismo de lactose e galactose (DONG; DICKSON, 1997). O repressor Mig1p se liga ao promotor de genes que codificam Gal1p (galactocinase) e Gal4p (ativador transcricional) em *S. cerevisiae*, enquanto em *K. lactis* ele se liga somente no promotor do gene *GAL1* (DONG; DICKSON, 1997). No mutante de *S. cerevisiae* *ScGal80*, a repressão por glicose é ainda mantida pela atividade do repressor Mig1. Em *K. lactis*, a repressão dos genes, cujos produtos estão envolvidos com a assimilação de lactose, dentre os quais o gene *LAC12* que codifica a lactose permease é exercida principalmente pelo repressor KIGal80p.

2.4. Regulação da transcrição de genes do metabolismo de lactose e galactose em leveduras

O repressor KIGal80p, o ativador transcricional KIGal4p e a enzima galactocinase (KIGal1p) compõem os reguladores envolvidos na expressão dos genes do metabolismo de lactose e galactose (LAC/GAL regulon). Galactose é o sinal intracelular que ativa a expressão dos genes que compõem o LAC/GAL regulon, portanto a indução por galactose não requer o seu metabolismo, mas a indução por lactose requer a atividade da enzima β -galactosidase, que hidrolisa este açúcar liberando glicose e galactose (ZENKE et al., 1996; CARDINALI et al., 1997). A fosforilação da galactose não é requerida para a indução. Em vez disso, a fosforilação leva ao consumo do indutor (ZACHARIAE, 1993). Os genes *LAC4* e *LAC12*, que codificam a enzima β -galactosidase e a lactose permease, respectivamente, são fortemente regulados em nível pós transcricional com os genes que codificam enzimas do metabolismo de galactose (LACY; DICKSON, 1981; WEBSTER E DICKSON, 1988).

A transdução do sinal galactose para maquinaria de transcrição é um dos mais bem entendidos exemplos de sinalização de nutrientes em

eucariotos. A KIGal1p desempenha ambas as funções: catalítica pela atividade de galactocinase e regulatória (MEYER et al., 1991). As duas funções são independentes e separáveis por mutação. Somente a função regulatória é essencial para a ativação da KIGal4p (VOLLENBROICH et al., 1999; ZENKE et al., 1996; ZENKE et al., 1999). Em *S. cerevisiae*, a função regulatória é principalmente conferida pelo produto do gene *ScGAL3*, bastante similar a ScGal1p e KIGal1p, porém com ausência de atividade enzimática (BHAT; HOPPER 1992). É interessante ressaltar que o ativador KIGal4p ativa a transcrição dos genes do metabolismo de lactose e galactose, além da sua própria transcrição, bem como a transcrição do seu repressor (KIGal80p). Em *S. cerevisiae* o ativador ScGal4p não ativa a sua própria transcrição (CZYZ et al., 1993; ZACHARIAE, 1993). A indução da expressão do gene *KIGAL80* pelo ativador KIGal4p na linhagem selvagem cria um mecanismo “feedback” de regulação negativa, que é essencial para a manutenção e o estabelecimento da repressão por glicose (ZENKE et al., 1993).

A Gal80p é bem conservada entre *S. cerevisiae* e *K. lactis* e regula, negativamente, a Gal4p na ausência de galactose por interagir com seu domínio de ativação (VOLLENBROICH et al., 1999; ZENKE et al., 1996). A interação da KIGal1p com a KIGal80p permite a ativação da KIGal4p e, conseqüentemente, a expressão dos genes do LAC/GAL regulon. A interação entre KIGal1p e KIGal80p depende da atividade regulatória da KIGal1p, a qual requer a ligação dos substratos galactose e ATP, que conduz à mudança de conformação necessária para a interação. A KIGal1p apresenta uma menor afinidade pelo repressor KIGal80p, comparada com a afinidade do KIGal80 pelo ativador KIGal4p (ANDERS et al., 2006). Além disso, a interação da KIGal1p com o KIGa80 é incompatível com a interação entre KIGal80p e KIGal4p (ANDERS et al., 2006). Esses autores relataram que a dissociação do repressor KIGal80 do domínio de ativação do ativador KIGal4p é a base do mecanismo que leva à ativação de KIGal4p (Figura 3). Modelagem matemática baseada nas afinidades de KIGal1p e KIGal4p por KIGal80p revela que a ativação do regulon é baseada na competição entre KIGal4p e KIGal1p por KIGal80 e é alcançada eficientemente pela interação de duas moléculas de KIGal1p com KIGal80p no estado dimérico (ANDERS et al., 2006).

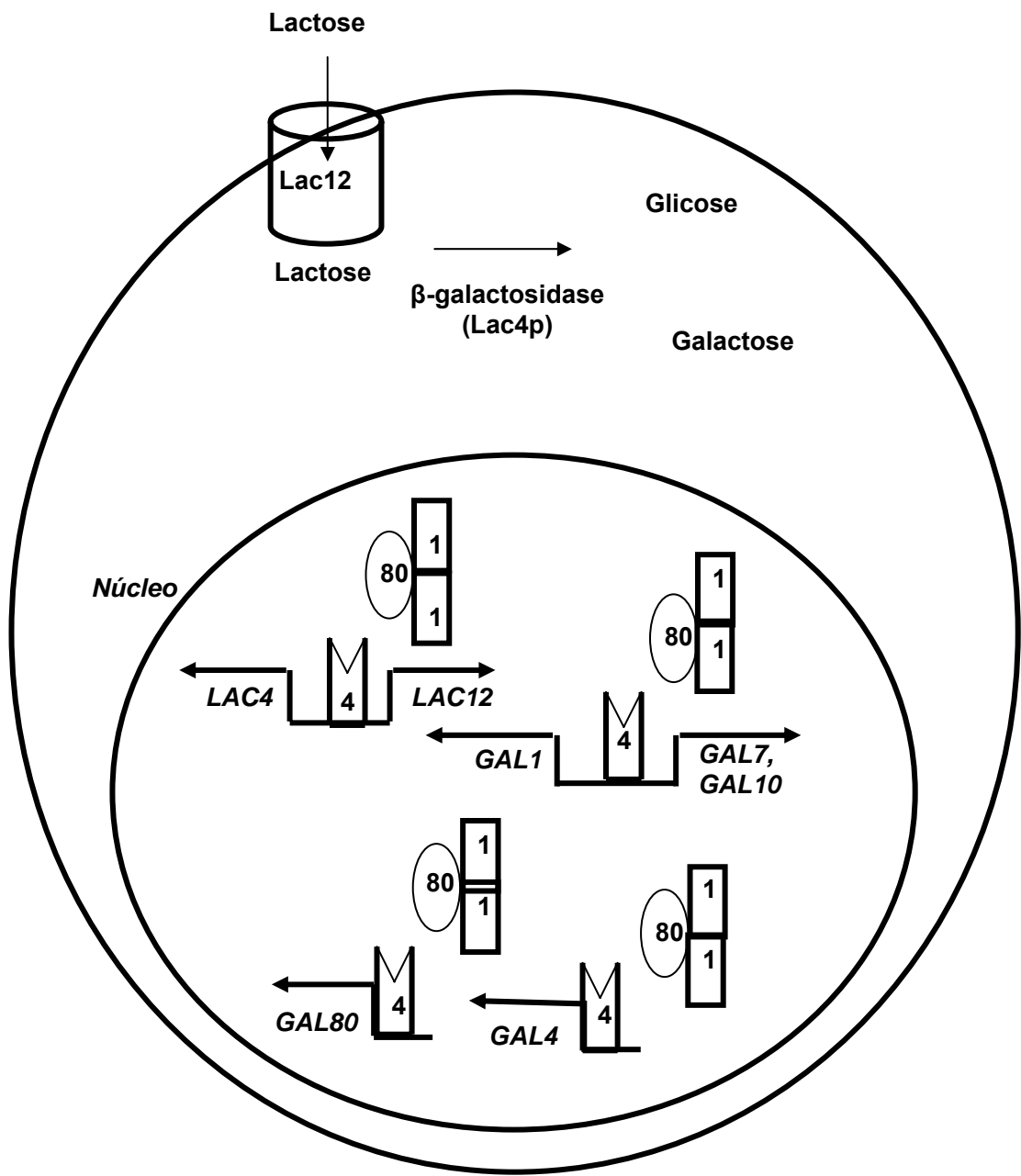


Figura 3 – Regulação do metabolismo de lactose e galactose em nível transcricional em *Kluyveromyces lactis*.

2.5. Regulação pós-traducional de transportadores em leveduras

A expressão de genes transportadores de nutrientes, como de açúcares, aminoácidos e amônia em leveduras, está sujeita à regulação pós-traducional durante o curso da via de secreção pelo direcionamento das permeases para degradação vacuolar (ARVAN et al., 2002). As permeases

podem atingir o vacúolo a partir da membrana plasmática ou a partir da rede Trans-Golgi (Figura 4).

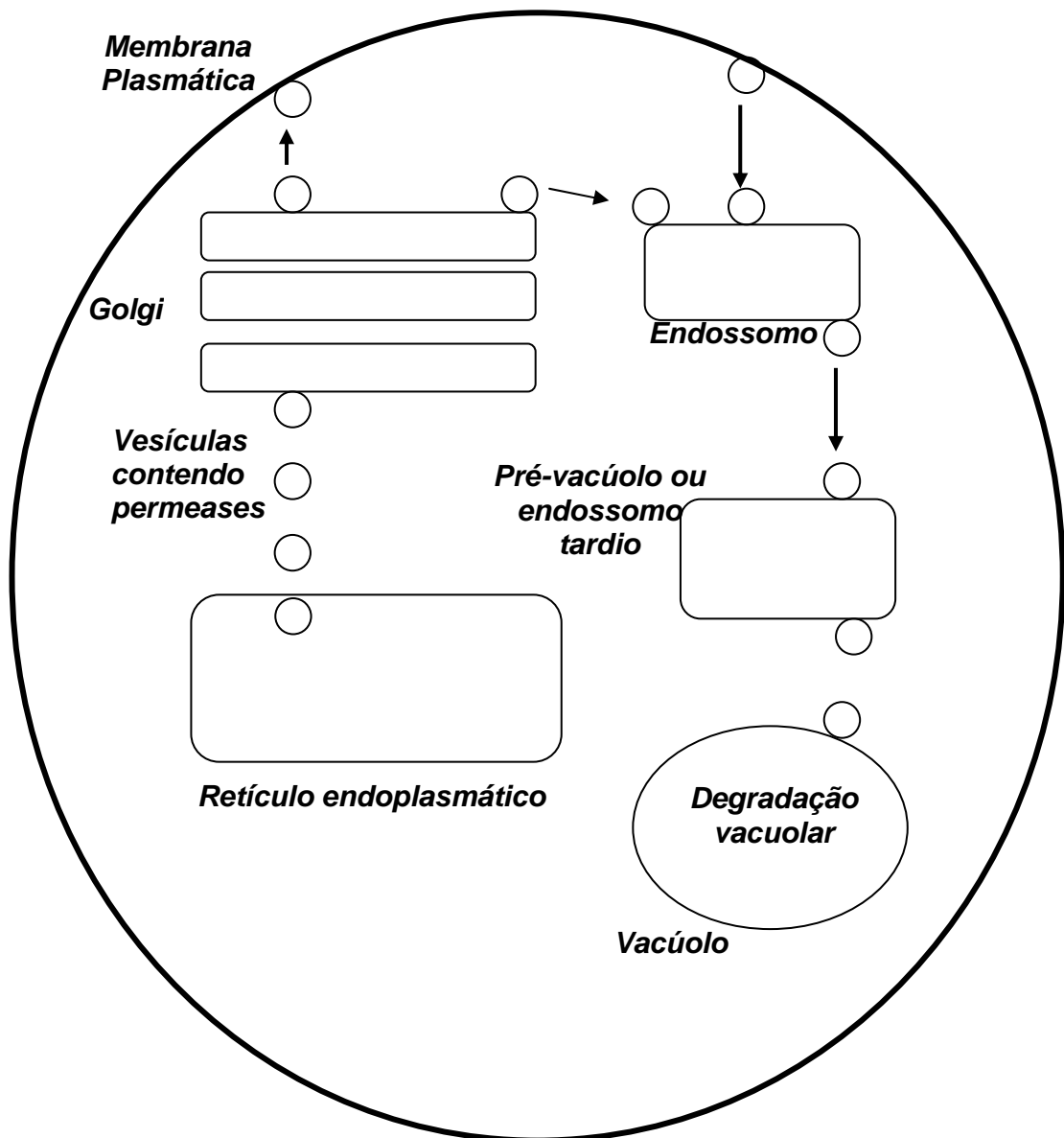


Figura 4 – Regulação pós-traducional de permeases de nutrientes em leveduras.

As proteínas secretadas para o meio extracelular, as proteínas de superfície celular e as proteínas destinadas para os endossomos ou vacúolo são distribuídas no Trans-Golgi e endereçadas para os seus destinos finais

(BOWERSA; STEVENSB, 2005). Portanto, o Trans-Golgi é o maior ponto de ramificação de proteínas na via de secreção (ROBERG et al., 1997).

Diferentes vesículas brotam do Trans-Golgi, e algumas delas atingem os endossomos carregando proteínas de membrana do vacúolo e proteínas solúveis para o pré-vacúolo e vacúolo (HORAZADOVSKY et al., 1995; CONIBEAR; STEVENS, 1995), enquanto os outros dois tipos de vesículas transportam proteínas para a membrana plasmática (HARSAY; BRETSCHER, 1995). Uma dessas vesículas segue uma rota direta do Trans-Golgi para a superfície celular, enquanto o outro tipo atinge a membrana plasmática via endossomos (HARSAY; BRETSCHER, 1995; HARSAY; SCHEKMAN, 2002). A rota de vesículas que transportam proteínas do Golgi para o vacúolo via endossomos é a mais conhecida. O exemplo clássico de proteínas que seguem essa via é carboxipeptidase (CPY). A outra rota desvia da rede de endossomos, atingindo o vacúolo diretamente. O exemplo mais conhecido de proteína transportada pelas vesículas que seguem essa via é a fosfatase alcalina (ALP) (STEEP et al., 1997; COWLES^b et al., 1997; PIPER et al., 1997).

O transporte vesicular do Trans-Golgi para os endossomos requer a capa de clatrina e proteínas adaptadoras desta. A capa de clatrina é requerida para o brotamento da vesícula, e as proteínas adaptadoras de clatrina se ligam tanto na clatrina quanto nas proteínas que serão transportadas pela vesícula, estabelecendo uma ligação entre formação de vesículas e distribuição de proteínas. Efetivamente, as proteínas adaptadoras Gga ligam-se à ubiquitina adicionada em algumas proteínas na rede Trans-Golgi. Portanto, o reconhecimento das proteínas destinadas ao endossomo depende da sua ubiquitinação (PUERTOLLANO; BONIFACINO et al., 2004; BABST, 2004; PELHAM, 2004). Diferente dessa via, o transporte de vesículas que atingem diretamente o vacúolo a partir do Trans-Golgi não necessitam de clatrina. A fosfatase alcalina ALP e outra proteína dessa via (Vam3p) requerem o complexo adaptador AP3, o qual consiste de quatro proteínas: a Apl6p (homóloga à adaptina h de mamíferos), a Apl5p (homóloga à adaptina y de mamíferos), a Apm3p (homóloga à subunidade A de mamíferos), e Aps3p (homólogo à subunidade J) (STEEP et al., 1997; PANEK et al., 1997; COWLES et al., 1997).

A “Vacuolar Protein Sorting” da Classe B (Vps41p) associa-se com o complexo AP3, participando da formação de vesículas no Trans-Golgi. A Vps41p também se associa com as proteínas do Complexo Vps C que age nas últimas etapas da via de transporte (WURMSER et al., 2000; PRICE et al., 2000), providenciando uma ligação entre a seleção de proteínas a serem incorporadas na vesícula de maneira dependente do complexo AP3 e a eventual fusão dessas vesículas com as membranas-alvo (DARSOW et al., 2001).

A ligação covalente de ubiquitina em proteínas eucarióticas funciona como um processo de marcação para a subsequente degradação. Esse processo envolve a transferência seqüencial de ubiquitina para resíduos específicos de lisina em proteínas e é mediado pela tríade de enzimas E1-E2-E3 (enzima ativadora de ubiquitina (E1), enzima conjugadora de ubiquitina (E2) e proteína ubiquitina ligase (E3), culminando com a formação de uma ligação isopeptídica entre a glicina C-terminal da ubiquitina e o grupo ϵ -amino dos resíduos de lisina da proteína. A especificidade do reconhecimento da proteína sujeita à marcação é, em grande parte, devida a E3, embora certo grau de especificidade provavelmente resulte da interação da E2 com a E3. A ligação de ubiquitina a proteínas apresenta papel importante em duas vias de degradação. As proteínas de vida curta, as proteínas nucleares e as proteínas associadas com o retículo endoplasmático são poliubiquitinadas e, portanto, marcadas para degradação no proteossomo 26S, um complexo de multi-subunidades catalíticas (HERSHKO; CIECHANOVER, 1998; HILT; WOLF, 1996; HOCHSRASSER, 1996; PICKART, 1997; PLEMPER et al., 1999). A monoubiquitinação de proteínas no Trans-Golgi ou na membrana plasmática marcam as proteínas de superfície celular para a degradação no vacúolo.

Alguns estudos indicam que a distribuição da maioria das proteínas de membrana destinadas à degradação no vacúolo ocorre durante a maturação do endossomo tardio ou pré-vacúolo em endossomos multivesiculares (KATZMANN et al., 2003; RAIBORG et al., 2003; BABST, 2005). Os genes VPS (Vacuolar Protein Sorting) codificam proteínas dos complexos protéicos ESCRT (Endossomal Sorting Complex Required for Transport), designados como ESCRT0, ESCRTI, ESCRTII e ESCRT III.

Esses complexos são requeridos para a formação de vesículas luminais que ocupam o interior dos endossomos multivesiculares. Essas vesículas contêm proteínas de membrana que chegam ao pré-vacúolo, tanto pelo tráfego vesicular a partir do Trans-Golgi quanto pela via endocítica. A maioria das proteínas, normalmente liberadas para o lúmen do vacúolo, requer a ubiquitinação como um sinal para a sua incorporação em vesículas do endossomo multivesicular. O complexo ESCRT 0, constituído pelas proteínas Vps27 e Hse1, atua no pré-vacúolo como um receptor do cargo de proteínas ubiquitinadas. Tanto a Vps27p quanto a Hse1p contêm motivos de interação com ubiquitina que foram capazes de interagir *in vitro* com ubiquitina (BILODEAU et al., 2002; SHIH et al., 2002). Além de interagir com a carga de proteínas ubiquitinadas, o complexo ESCRT 0 se liga tanto ao lipídeo PI3P, através do domínio FYVE da Vps27p, quanto na proteína Vps23p do complexo ESCRT 1, via motivos presentes na região C-terminal da Vps27p (KATZMANN et al., 2003; BILODEAU et al., 2003). É sugerido que o complexo ESCRT 0 associa-se com a membrana por ligações tanto com o cargo de proteínas ubiquitinadas quanto com o lipídeo PI3P e recruta o complexo ESCRT1 (KATZMANN et al., 2003). Além de recrutar o complexo ESCRT1 para a membrana do pré-vacúolo, o complexo ESCRT 0 pode interagir com a ubiquitina ligase (Rp5p), recrutando essa enzima para a membrana do pré-vacúolo (BOWERS et al., 2004).

O complexo ESCRT I liga-se a carga de proteínas ubiquitinadas, bem como aos complexos ESCRT II e III, recrutando os últimos (BABST et al., 2002; BOWERS et al., 2002; BABST et al., 2002). O ESCRT II é um complexo de proteínas em forma de Y, que interage tanto com o complexo ESCRT I quanto com o complexo ESCRT III. A interação do ESCRT II com o ESCRT III aumenta a ligação do último na membrana pela interação com a Vps20p (BABST et al., 2002; BOWERS et al., 2002; TEO et al., 2004).

A carga de proteínas ubiquitinadas é ligada aos complexos ESCRT 0, I e II, durante a distribuição de proteínas no endossomo tardio ou pré-vacúolo (ALAM et al., 2004). O complexo ESCRT III é recrutado na membrana do pré-vacúolo por múltiplos mecanismos, dentre os quais incluem: a ligação com os complexos ESCRT I e II, a modificação de lipídeos e as interações lipídicas. Além disso, o complexo ESCRT III também

interage direta ou indiretamente com as proteínas Vps4p, Vps46p, Vps60p, Vta1p e Bro1p (BOWERS et al., 2002; SHIFLETT et al., 2004; GAVIN et al., 2002). A Bro1p recruta o complexo ESCRT III, presumivelmente via interação da Bro1p com a Vps32p. Além disso, a enzima Bro1p recruta a enzima responsável pela desubiquitinação (Doa4p) (BOWERS et al., 2002; ODORIZZI et al., 2003; LUHTALA; ODORIZZI et al., 2004). Embora a desubiquitinação de proteínas antes das suas inclusões dentro das vesículas luminais seja importante para o próprio direcionamento dessas proteínas no endossomo multivesicular, essa etapa não é essencial para a inclusão das proteínas dentro da vesícula luminal em brotamento. Além disso, a desubiquitinação é essencial para a manutenção dos níveis normais de ubiquitina (LOSKO et al., 2001; AMERIK et al., 2000). O complexo ESCRT III também recruta a AAA-ATPase Vps4p, cuja atividade é requerida para a dissociação dos complexos ESCRT da membrana, liberando os complexos para a subsequente reciclagem e, conseqüentemente, adicionais ciclos de direcionamento de proteínas para o vacúolo (BABST et al., 1998).

Embora defeitos na ubiquitinação de proteínas, reconhecimento pela maquinaria ESCRT e desubiquitinação no endossomo multivesicular possam levar ao acúmulo de proteínas em membranas endossomais e perivacuolares, estudos recentes indicam a existência de vias alternativas que permitem a reciclagem de proteínas de membrana a partir dos últimos estágios da distribuição vacuolar (BABST et al., 2000; NIKKO et al., 2003; BUGNICOURT et al., 2004).

Proteínas de membrana são muitas vezes internalizadas constitutivamente, porém a modulação da taxa de internalização é induzida pelo *status* nutricional, como por exemplo, a utilização de fontes preferenciais de carbono e nitrogênio, a escassez nutricional e a ligação dos próprios substratos (HORAK, 1997).

Em leveduras, a escassez de nutrientes induz o direcionamento da permease de triptofano (Tat2p) para a degradação vacuolar (BECK et al., 1999). O transportador de íons metálicos Smf1p tem sua localização regulada entre membrana plasmática e vacúolo, em resposta à disponibilidade desses íons no meio extracelular (LIU et al., 1999). A permease de uracila (Fur4p) é encontrada na membrana plasmática em

células em crescimento exponencial, mas, aparentemente, é sujeita a uma rápida endocitose, seguida por degradação vacuolar, quando as células são expostas a condições limitantes de nutrientes (GALAN et al., 1994). Inicialmente, a permease é ubiquitinada em resíduos de lisina adjacentes à seqüência PEST presente no N-terminal.

A regulação da distribuição intracelular em resposta à disponibilidade de nutrientes vem sendo estudada extensivamente para a permease de aminoácidos Gap1p. Quando *S. cerevisiae* é cultivada em amônia ou uréia como fonte de nitrogênio, Gap1p é transportada do Golgi para o vacúolo em um mecanismo que envolve a ubiquitinação, porém, quando *S. cerevisiae* é crescida em meio com uma fonte pobre de nitrogênio, a exemplo da prolina, a Gap1p é transportada do Golgi para a membrana plasmática. A proteína cinase Npr1 tem papel central no controle fisiológico da distribuição da Gap1p, e esse controle não é exercido somente sobre a Gap1p na membrana plasmática, mas também sobre Gap1p nos últimos estágios da via de secreção de proteínas (CRAENE et al., 2001). No mutante Npr1, a Gap1p é destinada à degradação no vacúolo, de forma similar ao que ocorre em crescimento sobre amônia, ou seja, o papel principal da cinase Npr1 é prevenir a internalização da permease Gap1.

Transportadores de açúcar que são induzidos pelos próprios substratos, incluindo a permease de galactose (Gal2p), a permease de maltose (Mal61p) e as permeases de hexose (Hxt6p e Hxt7p), representam um grupo de permeases que são significativamente degradadas na presença de glicose. A degradação ocorre por um mecanismo referido como inativação induzida por glicose ou inativação catabólica, devido à aparente analogia com a inativação de enzimas gliconeogênicas (HOLZER 1989). Já a da permease Gal2p é firmemente regulada pela fonte de carbono em diferentes níveis de expressão. Em nível pós-traducional, é inativada pelo processo de internalização induzida por glicose (LEMON et al., 2000; MATERN; HOLZER, 1977). A ubiquitinação da permease Gal2p mediada pela tríade de enzimas de conjugação de ubiquitina (Ubc1p- Ubc4p- Ubc5p) e a ubiquitina proteína ligase Npi1/Rsp5p constituem uma etapa essencial para a internalização e degradação vacuolar. A monoubiquitinação é suficiente

para a internalização da permease pela via endocítica (HORAK; WOLF, 2001).

Similarmente, a permease de maltose também é sujeita à internalização induzida por glicose, e a etapa de ubiquitinação também é essencial (MEDINTZ et al., 2000). A região N-terminal citoplasmática da permease de maltose contém uma seqüência PEST, que é uma região rica em prolina, aspartato, glutamato, serina e treonina. Essa seqüência é comumente encontrada em permeases que são sujeitas a uma rápida internalização pela via endocítica e à conseqüente perda da atividade de transporte (MEDINTZ et al., 1998; MEDINTZ et al., 2000). A fosforilação de resíduos de serina e treonina na região N-terminal da permease não é requerida para a internalização induzida por glicose, mas sim requerida na progressão da permease internalizada a partir do pré-vacúolo para o vacúolo (GADURA; MICHELS, 2006). A permease de maltose atinge o vacúolo tanto a partir da membrana plasmática quanto a partir da rede Trans-Golgi (GADURA; MICHELS, 2006).

Os transportadores de alta afinidade por glicose (Hxt6p-Hx7p) são também marcados para a degradação, atingindo o vacúolo pela via endocítica. A presença de altas concentrações de glicose e reduzidas concentrações de nitrogênio é essencial (KRAMPE; BOLES, 2002).

É interessante ressaltar que o papel da cinase Snf1p de *K. lactis* não é exercido somente em nível transcricional. A deleção do gene *KISNF1* aboliu completamente a atividade de transporte da permease de lactose (Lac12p) (DONG; DICKSON, 1997). Existe evidência de que a regulação exercida por KISnf1p sobre o transporte de lactose ocorre em nível pós-transcricional, porque os níveis de transcrito do gene *KILAC12* foram similares na linhagem selvagem e na mutante *Klsnf1*. Quando o gene GFP (Green Fluoresce Protein) foi fusionado ao gene *KILAC12*, observou-se uma pronunciada localização da Lac12GFPP em compartimentos intracelulares da linhagem mutante, enquanto na selvagem a localização da permease foi mais pronunciada na membrana plasmática (WIEDEMUTH; BREUNIG, 2005). Esse parece ser o primeiro relato que indica o envolvimento da cinase Snf1p na localização subcelular de um transportador de açúcar. Assim como ocorre no transporte de lactose em *K. lactis*, a mutação no gene *SNF1* em *S.*

cerevisiae também conduz à perda da atividade de transporte de maltose, embora os níveis de transcrito tenham sido muito similares (HU et al., 2000). Esses autores relataram que Snf1p é requerida para a síntese da permease de maltose no nível pós-transcricional.

O papel de KISnf1p na localização intracelular da Lac12p não é elucidado, mas importante no direcionamento ou na estabilização da permease na membrana plasmática, ou em ambos (WIEDEMUTH; BREUNIG, 2005).

2.6. Influência da concentração de oxigênio no transporte de açúcares em leveduras

Leveduras podem ser agrupadas de acordo com o seu metabolismo energético. A levedura *S. cerevisiae* que cresce utilizando o metabolismo fermentativo em condições aeróbicas é classificada como Crabtree positiva (BREUNIG et al., 2000), enquanto *K. lactis* é classificada como respir-fermentativa, pois cresce utilizando simultaneamente tanto o metabolismo fermentativo quanto o metabolismo respiratório (SISO et al., 1996).

K. lactis é incapaz de crescer em galactose, rafinose e maltose, quando a cadeia respiratória é bloqueada por antimicina, porém, com a introdução de genes adicionais que codificam a permease de galactose de *S. cerevisiae*, a linhagem foi capaz de crescer, indicando que o transporte de açúcar é uma etapa importante no controle do fluxo fermentativo em leveduras (GOFFRINI et al., 2002). Nos últimos anos, alguns experimentos reforçam a idéia de que o transporte de açúcar é etapa importante no controle do fluxo glicolítico e conseqüentemente, no controle do fluxo respiratório e fermentativo (YE et al., 1999; ELBING et al., 2004; OTTERSTEDT et al., 2004; LEMAIRE et al., 2004). Além disso, o oxigênio parece ter um papel crucial na regulação da atividade de transporte em leveduras (SILVEIRA et al., 2005; OTTERSTEDT et al., 2004). A linhagem mutante de *S. cerevisiae*, na qual os 20 transportadores de hexose foram deletados e o transporte de glicose ocorre em função do transportador quimérico Hxt1p e Hxt7p, o crescimento foi exclusivamente à custa da respiração (OTTERSTEDT et al., 2004). Contudo, essa linhagem mutante

aciona o metabolismo fermentativo quando crescida em condições anóxicas (OTTERSTEDT et al., 2004). Em *Kluyveromyces marxianus*, a velocidade de consumo de lactose é maior em condições hipóxicas do que em condições normóxicas, indicando que concentração de oxigênio tem papel importante no transporte desse açúcar (SILVEIRA et al., 2005). Além disso, esses autores observaram que a velocidade de produção de etanol também é maior em condições hipóxicas, indicando uma ligação entre transporte e fluxo fermentativo.

Em leveduras, ainda não está claro se a concentração de oxigênio regula a expressão de transportadores de açúcar, porém em células de mamíferos a concentração de oxigênio está envolvida na expressão de transportadores de açúcar e de genes glicolíticos, visto que em condições hipóxicas a expressão desses genes é aumentada (WEBSTER; MURPHY, 1988 citados por LANDO et al., 2003).

Nos últimos anos, vários estudos contribuíram para o melhor entendimento da regulação de genes em nível transcricional, cujos produtos estão envolvidos na adaptação a condições hipóxicas e anóxicas, porém ainda não é muito conhecido como a célula monitora a concentração de oxigênio e transmite o sinal para a maquinaria de proteínas envolvidas com a expressão desses genes (KWAIST et al., 1998; DAAGSGARD, 2001).

Quando as leveduras são cultivadas em condições aeróbias, o fator de transcrição que responde ao grupo prostético heme, Hap1p, ativa a transcrição de genes aeróbicos, bem como alguns genes hipóxicos. Nas mesmas condições, o complexo Hap2/3/4/5p ativa a transcrição de genes aeróbicos, dependendo da fonte de carbono (HA et al., 1996). Além disso, o repressor transcricional Rox1p, cujo gene é transcricionalmente induzido pelo ativador Hap1p, recruta os repressores gerais Ssn6p e Tup1p causando a repressão de aproximadamente 70 genes hipóxicos (KASTANIOTIS; ZITOMER, 2000; ZITOMER et al., 1997). O repressor transcricional Mot3 também está envolvido na repressão de alguns genes hipóxicos, porém o seu papel não é tão claro como o do repressor Rox1p (KASTANIOTIS et al., 2000). Quando o nível de oxigênio diminui, a expressão do gene *ROX1* pela Hap1p é reduzida, e conseqüentemente os genes hipóxicos e anóxicos são transcritos (DECKERT et al., 1995).

Em leveduras, a mudança de condição aeróbica para condição hipóxica é acompanhada pela alteração da expressão de genes envolvidos com a adaptação à baixa disponibilidade de oxigênio. Entre os genes induzidos durante a hipoxia estão os chamados genes hipóxicos (*ERG11*, *EM13*, *OLE1*), cujos produtos utilizam oxigênio como substrato, genes aeróbicos cujos produtos estão relacionados com a respiração e troca de ATP entre o citoplasma e a mitocôndria (*COX5b*, *CYC7*, *ACC3*), genes (*SUT1*, *HGM2*, *CPR1*) cujos produtos estão envolvidos no transporte e biossíntese de ergosterol e outros genes cujos produtos não têm ainda funções definidas (ZITOMER et al., 1997; KWAST et al., 1998).

Em *S. cerevisiae*, a molécula heme está envolvida na regulação transcricional de genes que respondem à concentração de oxigênio. A molécula heme liga-se diretamente a fatores de transcrição, como a Hap1 e o complexo HAP2/3/4/5, indicando a importância da concentração de heme. Acredita-se que a disponibilidade de oxigênio afeta os níveis de heme e, portanto, a função daqueles fatores transcricionais (ZITOMER; LOWRY, 1992; ZHANG; GUARENTE, 1995).

Outro mecanismo tem bases em evidências que apontam para o envolvimento do estado redox de uma heme-proteína sobre o controle da expressão de genes hipóxicos em leveduras. O estado dessa heme-proteína regula a expressão de pelo menos dois genes hipóxicos: *OLE1* and *CYC7* (KWAST et al., 1999). Hon et al. (2003) propuseram que o oxigênio não afeta diretamente a atividade do fator transcricional Hap1p, mas afeta as etapas da biossíntese de heme. As enzimas biossintéticas de heme, ferroquetolase e protoporfirinogen oxidase IX, que afetam a expressão de genes aeróbicos regulados por heme, são mitocondriais, evidenciando um papel importante no monitoramento e sinalização da concentração de oxigênio (HON et al., 2003). Contudo, é possível que outros mecanismos de monitoramento da concentração de oxigênio existam, porque alguns estudos realizados numa amplitude de concentração de oxigênio, na qual a concentração de heme não varia, a expressão de alguns genes é afetada (BURKE et al., 1997; KWAST et al., 1998). De fato, nos últimos anos alguns estudos têm apontado para o nível de esterol como fator importante na sinalização por oxigênio (KWAST et al., 2002; DAVIES; RINE, 2006). O fator

de transcrição Upc2 é ativado com a diminuição da concentração de oxigênio em resposta à queda dos níveis de esterol, apresentando importante contribuição para adaptação à hipoxia (DAVIES; RINE, 2006). Além disso, tanto em células de leveduras quanto em células de mamíferos, a cadeia respiratória e a enzima citocromo-c-oxidase parecem agir no monitoramento da concentração de oxigênio e indução de genes hipóxicos (POYTON, 1999). Em células de mamíferos tem sido suposto que a indução de genes hipóxicos pode acontecer pela produção de espécies reativas de oxigênio (CHANDEL et al., 1996; CHANDEL et al., 1998; DURANTEAU et al., 1998). Em leveduras, o papel de espécies reativas de oxigênio no controle da expressão de genes nucleares ainda não está claro (DAGSGAARD et al., 2001).

REFERÊNCIAS

- AHUATZI, D.; HERRERO, P.; de la CERA, T.; MORENO, F. The glucose-regulated nuclear localization of hexokinase 2 in *Saccharomyces cerevisiae* is Mig1-dependent. **J. Biol Chem.**, v. 279, p. 14440-14446, 2004.
- ALAM, S.L.; SUN, J.; PAYNE, M.; WELCH, B.D.; BLAKE, B.K.; DAVIS, D.R., MEYER, H.H.; EMR, S.D.; SUNDQUIST, W.I. Ubiquitin interactions of NZF zinc fingers, **EMBO J.**, v. 23, p. 1411-1421, 2004.
- AMERIK, A.Y.; NOWAK, J.; SWAMINATHAN, S.; HOCHSTRASSER, M. The Doa4 deubiquitinating enzyme is functionally linked to the vacuolar protein-sorting and endocytic pathways. **Mol. Biol. Cell**, v. 11, p. 3365-3380, 2000.
- ANDERS, A.; LILIE, H.; FRANKE, K.; KAPP, L.; STELLING, J.; GILLES, E.D.; BREUNIG, K.D. The galactose switch in *Kluyveromyces lactis* depends on nuclear competition between Gal4 and Gal1 for Gal80 binding. **J. Biol. Chem.**, 281(39): 29337-29348, 2006.
- ARVAN, P.; ZHAO, X.; RAMOS-CASTANEDA. J.; CHANG, A. **Secretory** pathway quality control operating in Golgi, plasmalemmal, and endosomal systems. **Traffic**, v. 3, p. 771-780, 2002.
- BABST M.; WENDLAND, B.; ESTEPA, E.J.; EMR, S.D. The Vps4p AAA ATPase regulates membrane association of a Vps protein complex required for normal endosome function. **EMBO J.**, v. 17, p. 2982-2993, 1998.
- BABST, M.; ODORIZZI, G.; ESTEPA, E.J.; EMR, S.D. Mammalian tumor susceptibility gene 101 (TSG101) and the yeast homologue, Vps23p, both function in late endosomal trafficking. **Traffic**, v.1 p. 548-258, 2000

BABST, M.; KATZMANN, D.J.; ESTEPA-SABAL, E.J.; MEERLOO, T.; EMR, S.D. ESCRT-III: an endosome-associated heterooligomeric protein complex required for MVB sorting. **Dev. Cell**, v. 3, p. 271-282, 2002.

BABST, M.; KATZMANN, D.J.; SNYDER, W.B.; WENDLAND, B.; EMR, S.D. Endosome-associated complex, ESCRT-II, recruits transport machinery for protein sorting at the multivesicular body. **Dev. Cell**, v. 3, p. 283-289, 2002.

BABST, M. GGAing ubiquitin to the endosome, **Nat. Cell Biol.**, v. 6 p. 175-177, 2004.

BABST, M. A protein's final ESCRT. **Traffic**, v. 6, p. 2-9., 2005.

BÄR, D.; GOLBIK, R.; HÜBNER, G.; LILIE, H.; MÜLLER, E.C.; NAUMANN, M.; OTTO, A.; REUTER, R.; BREUNIG, K.D. The Unique Hexokinase of *Kluyveromyces lactis*: Molecular and functional characterization and evaluation of a role in glucose signaling. **J. Biol. Chem.**, v. 278, p. 39280-39286, 2003.

BARUFFINI, E.; GOFFRINI, P.; DONNINI, C.; LODI, T. Galactose transport in *Kluyveromyces lactis*: major role of the glucose permease Hgt1. **FEMS Yeast Res.**, v. 6, p. 1235-1242, 2006.

BHAT, P.J.; HOPPER, J.E. Overproduction of the GAL1 or GAL3 protein causes galactose-independent activation of the GAL4 protein: evidence for a new model of induction for the yeast GAL/MEL regulon. **Mol. Cell. Biol.**, v.12, p. 2701-2707, 1992.

BECK, T.; SCHMIDT, A.; HALL, M.N. Starvation induces vacuolar targeting and degradation of the tryptophan permease in yeast. **J. Cell Biol.**, v. 146, p. 1227-1238, 1999.

BETINA, S.; GOFFRINI, P.; FERRERO, I.; WÉSOŁOWSKI-LOUVEL, M. *RAG4* gene encodes a glucose sensor in *Kluyveromyces lactis*. **Genetics**, v. 158, p. 541-548, 2001

BILLARD, P.; MÉNART, S.; BLAISONNEAU, J.; MOLOTIN-FUKUHARA, M.; FUKUHARA, H. Glucose uptake in *Kluyveromyces lactis*: role of the *HGT1* gene in glucose transport. **J. Bacteriol.**, v.178, p. 5860-5866, 1996.

BILODEAU, P.S.; URBANOWSKI, J.L.; WINISTORFER, S.C.; PIPER, R.C. The Vps27p-Hse1p complex binds ubiquitin and mediates endosomal protein sorting. **Nat. Cell Biol.**, v. 4, p. 534-539, 2002.

BILODEAU, P.S.; WINISTORFER, S.C.; KEARNEY, W.R.; ROBERTSON, A.D.; PIPER, R.C. Vps27-Hse1 and ESCRT-I complexes cooperate to increase efficiency of sorting ubiquitinated proteins at the endosome, **J. Cell Biol.**, v. 163, p. 237-243, 2003.

BOLES, E.; HOLLENBERG, C.P. The molecular genetics of hexose transport in yeasts. **FEMS Microbiol. Rev.**, v. 21, p. 85-111, 1997.

BONEKAMP, F.J.; OOSTERON J. On the safety of *Kluyveromyces lactis* a review. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 41, p. 1-3, 1994.

BONIFACINO, J.S.; GLICK, B.S. The mechanisms of vesicle budding and fusion. **Cell**, v. 116, p. 153-166, 2004

BOWERS, K.; LOTTRIDGE, J.; HELLIWELL, S.B.; GOLDTHWAITE, L.M.; LUZIO, J.P.; STEVENS, T.H. Protein-protein interactions of ESCRT complexes in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Traffic**, v. 5, p. 194-210, 2004.

BOWERSA, K.; STEVENSB, H. Protein transport from the late Golgi to the vacuole in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1744, p. 438-454, 2005.

BREUNIG, K.D.; BOLOTIN-FUKUHARA, M.; BIANCHI, M.M.; BOURGAREL, D.; FALCONE, I. F.; FRONTALI, L.; GOFFRINI, P.; KRIJGER, J.J.; MAZZONI, C.; MILKOWSKI, C.; STEENSMA, H.Y.; WÉSOLOWSI-LOUVEL, M.; ZEEMAN, A.M. Regulation of primary carbon metabolism in *Kluyveromyces lactis*. **Enzyme. Microb. Technol.**, v. 26, p. 771-780, 2000.

BUGNICOURT, A.; FROISSARD, M.; SERETI, K.; ULRICH, H.D.; HAGUENAUER-TSAPIS, R.; GALAN, J.M. Antagonistic roles of ESCRT and Vps class C/HOPS complexes in the recycling of yeast membrane proteins. **Mol Biol. Cell.**, v. 15, p. 4203-4214, 2004.

BURKE, P. V.; RAITT, D. C.; ALLEN, L. A.; KELLOGG, E.A.; POYTON, R. O. Effects of oxygen concentration on the expression of cytochrome c and cytochrome c oxidase genes in yeast. **J. Biol. Chem.**, v. 272, p. 14705-14712, 1997.

CHANDEL, N. S.; BUDGINGER, G. R. S.; SCHUMACKER, P. T. Molecular oxygen modulates cytochrome c oxidase function. **J. Biol.Chem.** v. 271, p. 18672-18677, 1996.

CHANDEL, N. S.; MALTEPE, E.; GOLDWASSER, E.; MATHIEU, C. E.; SIMON, M. C.; SCHUMACKER, P. T. Mitochondrial reactive oxygen species trigger hypoxia-induced transcription Proc. Natl. Acad. Sci., v. 95, p. 11715-11720, 1998

CARDINALI, G.; VOLLENBROICH, V.; JEON, M. S.; DE GRAAF, A. A.; HOLLENBERG, C. P. Constitutive expression in gal7 mutants of *Kluyveromyces lactis* is due to internal production of galactose as an inducer of the Gal/Lac regulon. **Mol. Cell. Biol.**, v.17, p.1722-1730, 1997.

- CASSART, J. P.; GEORIS, I.; OSTLING, J.; RONNE, H.; VANDEHAUTE, J. The MIG1 repressor from *Kluyveromyces lactis*: cloning, sequencing and functional analysis in *Saccharomyces cerevisiae*. **FEBS Lett.**, v. 371, p. 191-194, 1995
- CELENZA, J.L.; MARSHALL-CARLSON, L.; CARLSON, M. The yeast SNF3 gene encodes a glucose transporter homologous to the mammalian protein. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, USA, v. 85, p. 2130-2134, 1988.
- CONIBEAR, E.; STEVENS, T.H. Vacuolar biogenesis in yeast: sorting out the sorting proteins. **Cell**, v. 83, p. 513-516, 1995
- COWLES, C.R.; ODORIZZI, G.; PAYNE, G.S.; EMR, S.D. The AP-3 adaptor complex is essential for cargo-selective transport to the yeast vacuole. **Cell**, v. 91, p.109-118, 1997.
- COWLES^b, C.R.; SNYDER, W.B.; BURD, C.G.; EMR, S.D. Novel Golgi to vacuole delivery pathway in yeast: identification of a sorting determinant and required transport component. **The EMBO Journal**, v. 16, p. 2769-2782, 1997.
- CRAENE, J. O., SOETENS, O., ANDRE, B. The Npr1 kinase controls biosynthetic and endocytic sorting of the yeast Gap1 permease. **J. Biol. Chem.**, v. 47, p. 43939-43948, 2001
- CZYZ, M.; NAGIEC, M. M.; DICKSON, R. C. Autoregulation of *GAL4* transcription is essential for rapid growth of *Kluyveromyces lactis* on lactose and galactose. **Nucleic Acids Res.**, v. 21, p. 4378-4382, 1993.
- DAGSGAARD, C.; TAYLOR, L.E.; O'BRIEN, K.M; POYTON, R.O. Effects of Anoxia and the mitochondrion on expression of Aerobic Nuclear COX genes in Yeast. **J. Bio Chem.**, v. 276, p. 7593-7601, 2001.
- DALLAS, P.; LAGRANGE, V. Aplicações de derivados de soro em produtos lácteos. **Indústria de Laticínios**, v. 2, n.13, p. 49-51, 1998.
- DARSOW, T.; KATZMANN, D. J.; COWLES, C.R.; EMR, S.D. Vps41p function in the alkaline phosphatase pathway requires homo-oligomerization and interaction with AP-3 through two distinct domains. **Mol. Biol. Cell**, v. 12, p. 37-51, 2001.
- DAVIES, B.S.J.; RINE, J. A role for sterol levels in oxygen sensing in *Saccharomyces cerevisiae*. **Genetics**. v. 174, p. 191-201, 2006.
- De DEKEN, R.H. The crabtree effect: a regulatory system in yeast. **J. Gen. Microbiol.**, v. 44, p. 149-56, 1966.

DE WINDE, J. H.; CRAUWELS, M.; HOHMANN, S.; THEVELEIN, J. M.; WINDERICKX, J. Differential requirement of the yeast sugar kinases for sugar sensing in establishing the catabolite-repressed state. **Eur. J. Biochem.**, v. 241, p. 633-643, 1996.

DECKERT, J.; PERINI, R.; BALASUBRAMANIAN, B.; ZITOMER, R.S. Multiple elements and auto-repression regulate Rox1, a repressor of hypoxic genes in *Saccharomyces cerevisiae*. **Genetics**, v. 139, p. 1149-1158, 1995.

DEVIT, M. J.; JOHNSTON, M. The nuclear exportin Msn5 is required for nuclear export of the Mig1 glucose repressor of *Saccharomyces cerevisiae*. **Curr. Biol.**, v. 9, p. 1231-1241, 1999.

DONG, J.; DICKSON, R.C. Glucose repress the lactose-galactose regulon in *Kluyveromyces lactis* through a SNF1 and MIG1- dependent pathway that modulates galactokinase (GAL1) gene expression. **Nucleic Acids Research** v. 25, p. 3657-3664, 1997.

DURANTEAU, J.; CHANDEL, N.S.; KULSISZ, A.; SHAO, Z.; SCHUMACKER, P.T. Intracellular signaling by reactive oxygen species during hypoxia in cardiomyocytes, **J. Biol. Chem.**, v. 273, p. 11619-11624, 1998.

ELBING, K.; LARSSON, C.; BILL, R.M.; ALBERS, E.; SNOEP, J.L.; BOLES, E.; HOHMANN, S.; GUSTAFSSON, L. Role of hexose transport in control of glycolytic flux in *Saccharomyces cerevisiae*. **Appl. Environ. Microbiol.** v. 70, p. 5323-5330, 2004

ENTIAN, K. D.; ZIMMERMANN, F. K.; SCHEEL, I. A partial defect in carbon catabolite repression in mutants of *Saccharomyces cerevisiae* with reduced hexose phosphorylation. **Mol. Gen. Genet.**, v. 156, p. 99-105, 1977.

FLORES, C.L.; RODRIGUEZ, C.; PETIT, T.; GANCEDO, C. Carbohydrate and energy yielding metabolism in non conventional yeasts. **FEMS Microbiol. Rev.**, v. 24, p. 507-529, 2000

GADURA, N.; MICHELS, C.A. Sequences in the N-terminal cytoplasmic domain of *Saccharomyces cerevisiae* maltose permease are required for vacuolar degradation but not glucose-induced internalization. **Curr Genet**, v. 50, p. 101-114, 2006.

GALAN, J.M.; VOLLAND, C.; URBAN-GRIMAL, D.; HAGUENAUER-TSAPIS, R. The yeast plasma membrane uracil permease is stabilized against stress induced degradation by a point mutation in a cyclin-like 'destruction box'. **Biochem. Biophys. Res. Comm.**, v. 201, p. 769-775, 1994.

GANCEDO, J.M. Yeast carbon catabolite repression. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.** v. 62, p. 334-361, 1998.

GAVIN, A.C.; BOSCHE, M.; KRAUSE, R.; GRANDI, P.; MARZIOCH, M.; BAUER, A.; SCHULTZ, J.; RICK, J.M.; MICHON, A.M.; CRUCIAT, C.M.; REMOR, M.; HOFERT, C.; SCHELDER, M.; BRAJENOVIC, M.; RUFFNER, H.; MERINO, A.; KLEIN, K.; HUDAK, M.; DICKSON, D.; RUDI, T.; GNAU, V.; BAUCH, A.; BASTUCK, S.; HUHSE, B.; LEUTWEIN, C.; HEURTIER, M.A.; COPLEY, R.R.; EDELMANN, A.; QUERFURTH, E.; RYBIN, V.; DREWES, G.; RAIDA, M.; BOUWMEESTER, T.; BORK, P.; SERAPHIN, B.; KUSTER, B.; NEUBAUER, G.; SUPERTI-FURGA, G. Functional organization of the yeast proteome by systematic analysis of protein complexes, **Nature**, v. 415, p. 141-147, 2002.

GEORIS, I.; KRIJGER, J.J.; BREUNIG, K.D.; VANDENHAUTE, J. Differences in regulation of yeast gluconeogenesis revealed by Cat8p-independent activation of *PCK1* and *FBP1* genes in *Kluyveromyces lactis*. **Mol. Gen. Genet.**, v. 1-2, p. 193-203, 2000.

GOFFRINI, P.; FICARELLI, A.; DONNINI, C.; LODI, T.; PUGLISI, P.P.; FERRERO, I. FOG 1 and FOG 2 genes required for the transcriptional activation of glucose-repressible genes of *Kluyveromyces lactis*, are homologous to GAL83 and SNF1 of *Saccharomyces cerevisiae*. **Curr Genet.**, v.29, p. 316-326, 1996.

GOFFRINI, P.; FERRERO, I.; DONNINI, C. Respiration-Dependent Utilization of Sugars in Yeasts: a Determinant Role for Sugar Transporters. **J. Bacteriol.**, v. 184, p. 427-432, 2002.

GOLBIK, R.; NAUMANN, M.; OTTO, A.; MÜLLER, E. C.; BEHLKE, J.; REUTER, R.; HÜBNER, G.; KRIEGEL, T. M. Regulation of phosphotransferase activity of hexokinase 2 from *Saccharomyces cerevisiae* by modification at serine-14. **Biochemistry**, v. 40, p. 1083-1090, 2001.

HARSAY, E., BRETSCHER, A. Parallel secretory pathways to the cell surface in yeast. **J. Cell Biology**, v. 131, p. 297-310, 1995

HARSAY, E.; SCHEKMAN, R. A subset of yeast vacuolar protein sorting mutants is blocked in one branch of the exocytic pathway. **J. Cell Biology**, v. 156, p. 271-285, 2002.

HEDBACKER, K.; HONG, S. P.; CARLSON, M. Pak1 protein kinase regulates activation and nuclear localization of Snf1-Gal83 protein kinase. **Molecular Cell Biology**, v. 24, p. 8255-8263, 2004.

HEDBACKER^b, K.; TOWNLEY, R.; CARLSON M. cAMP-dependent protein kinase regulates the subcellular localization of Snf1-Sip1 protein kinase. **Molecular Cell Biology**, v. 24, p. 1836-1843, 2004.

HEDBACKER, K.; CARLSON, M. Regulation of the nucleocytoplasmic distribution of Snf1-Gal83 protein kinase. **Eukaryot Cell**, v. 5(12), p. 1950-1956, 2006

HEIDRICH, K.; OTTO, A.; BEHLKE, J.; RUSH, J.; WENZEL, K.W.; KRIEGEL, T. Autophosphorylation-inactivation site of hexokinase 2 in *Saccharomyces cerevisiae*. **Biochemistry**, v. 36, p. 1960-1964, 1997.

HERRERO, P., MARTÍNEZ-CAMPA, C., AND MORENO, F. The hexokinase 2 protein participates in regulatory DNA-protein complexes necessary for glucose repression of the SUC2 gene in *Saccharomyces cerevisiae*. **FEBS Lett.**, v. 434, p. 71-76, 1998.

HERSHKO, A.; CIECHANOVER, A. The ubiquitin system. **Annu. Rev. Biochem.**, v. 67, p. 425-479, 1998.

Hilt, W.; Wolf, D.H. Proteasomes: destruction as a program. **Trends Biochem. Sci.**, v. 21, p. 96-102, 1996.

HOCHSTRASSER, M. Ubiquitin-dependent protein degradation. **Annu. Rev. Genet.**, v. 30, p. 405-439, 1996.

HOHMANN, S.; WINDERICK, J.; VALCK, D.; COBBAERT, P.; LUYTEN, K.; DE MERISMAN, C.; RAMOS, J.; THEVELEIN, J. M. Novel alleles of yeast hexokinase PII with distinct effects on catalytic activity and catabolite repression of SUC2. **Microbiology**, v. 145, p. 703-714, 1999

HOLZER, H. Proteolytic catabolite inactivation in *Saccharomyces cerevisiae*. **Revis Biol Celular**, v. 21, p. 305-319, 1989.

HON, T.; DODD, A.; DIRMEIER, R.; GORMAN, G.; SINCLAIR, P.R.; ZHANG, L.; POYTON, R.O. A mechanism of oxygen Sensing in Yeast: multiple oxygen-responsive steps in the heme biosynthetic pathway affect Hap1 activity. **J. Biol. Chem.**, v. 278, p. 50771-50780, 2003.

HONG, S.P.; LEIPER, F. C.; WOODS, A.; CARLING D.; CARLSON, M. Activation of yeast Snf1 and mammalian AMP-activated protein kinase by upstream kinases. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 100, p. 8839-8843, 2003.

HORAK, J. Yeast nutrient transporters. *Biochim. Biophys. Acta*, v. 1331, p. 41-79, 1997.

HORAK, J.; WOLF, D.H. Glucose-Induced monoubiquitination of the *Saccharomyces cerevisiae* Galactose transporter is sufficient to signal its internalisation. **J. Bacteriol.** v. 183, p. 3083-3088, 2001.

HORAZADOWSKI, B. F.; DEWALD, D.B.; EMR, S. Protein transport to the yeast vacuole. **Curr. Opin Cell Biol.**, v. 7, p. 544-551, 1995.

HU, Z.; YUE, Y.; JIANG, H.; ZHANG, B.; SHERWOOD, P. W.; MICHELS, C. A. Analysis of the mechanism by which glucose inhibits maltose induction of Mal gene expression in *Saccharomyces*. **Genetics**, v. 154, p. 121-132, 2000.

JIANG, R.; CARLSON, M. 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.**, v. 17, p. 2099-2106, 1997.

JONHSTON, M. Feasting, fasting and fermenting. Glucose sensing in yeast and other cells. **Trends Genetic**, v. 15, p. 29-33, 1999.

KASTANIOTIS, A.J.; ZITOMER, R.S. Rox1 mediated repression. Oxygen dependent repression in yeast. **Adv. Exp. Med. Bio.**, v. 475, p. 185-195, 2000.

KASTANIOTIS, A. J.; MENNELLA, T. A.; KONRAD, C. A.; TORRES, M.; ZITOMER, R. S. Roles of transcription factor Mot3 and chromatin in repression of the hypoxic gene *ANB1* in yeast. **Mol. Cell. Biol.**, v. 20, p. 7088-7098, 2000.

KATZMANN, D.J.; STEFAN, C.J.; BABST, M.; EMR, S.D. Vps27 recruits ESCRT machinery to endosomes during MVB sorting. **J. Cell Biol.**, v. 162, p. 413-423, 2003.

KIM, J.H.; JOHNSTON, M. Two glucose-sensing pathways converge on Rgt1 to regulate expression of glucose transporter genes in *Saccharomyces cerevisiae*. **J. Biol. Chem.** v. 281, p. 26144-26149, 2006.

KOSIKOWSKI, F.V. Whey utilization and whey products. **J. Dairy Science**, v. 62, p. 1149-1160, 1979.

KOURKOUTAS, Y.; DIMITROPOLOU, S.; KANELLAKI, M.; MARCHANT, R.; NIGAM, P.; BANAT, I.M.; KOUTINAS, A.A. High temperature alcoholic fermentation of whey using *Kluyveromyces marxianus* IMB3 yeast immobilized on delignified cellulosic material. **Bioresour. Technol.**, v. 82, p. 177-181, 2002

KRAAKMAN, L.; LEMAIRE, K.; MA, P.; TEUNISSEN, A.W.; DONATON, M.C.; VAN DIJCK, P.; WINDERICKX, J.; DE WINDE, J.H.; THEVELEIN, J.M. A *Saccharomyces cerevisiae* G-protein coupled receptor, Gpr1, is specifically required for glucose activation of the cAMP pathway during the transition to growth on glucose. **Mol. Microbiol.**, v. 32, p. 1002-1012, 1999.

KRAAKMAN^b, L. S.; WINDERICKX, J.; THEVELEIN, J. M.; DE WINDE, J. H. Structure-function analysis of yeast hexokinase: structural requirements for triggering cAMP signalling and catabolite repression. **Biochem. J.**, v. 343, p. 159-168, 1999.

KRAMPE, S.; BOLES, E. Starvation-induced degradation of yeast hexose transporter Hxt7p is dependent on endocytosis, autophagy and the terminal sequences of the permease. **FEBS Lett**, v. 25, p. 193-6, 2002.

KRIEGEL, T. M.; RUSH, J.; VOJTEK, A. B.; CLIFTON, D.; FRAENKEL, D. G. In vivo phosphorylation site of hexokinase 2 in *Saccharomyces cerevisiae* **Biochemistry**, v. 33, p. 148-152, 1994.

KUCHIN, S.; TREICH, I.; CARLSON, M. A regulatory shortcut between the Snf1 protein kinase and RNA polymerase II holoenzyme. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 97, p. 7916-7920, 2000.

KWAST, K.E.; BURKE, P.V.; POYTON, R.O. Oxygen sensing and the transcriptional regulation of oxygen responsive genes in yeast. **J. Exp. Biol.**, v. 201, p. 1177-1195, 1998.

KWAST, K.E.; BURKE, P.V.; STAAHL, B.T.; POYTON, R.O. Oxygen sensing in yeast: evidence for the involvement of the respiratory chain in regulating the transcription of a subset of hypoxic genes *Proc Natl Acad Sci.*, v.96, p. 5446-5451, 1999.

KWAST, K.E.; LAI, L.C.; MENDA, N.; JAMES, D.T. AREF, S. Genomic analyses of anaerobically induced genes in *Saccharomyces cerevisiae*: functional roles of Rox1 and other factors in mediating the anoxic response. **J. Bacteriol.**, v. 184, p. 250-265, 2002.

LACY, L.R.; DICKSON, R.C. Transcriptional Regulation of the *Kluyveromyces lactis* β -Galactosidase Gene. **Mol. Cell Biol.**, v.1, p.629-634, 1981.

LAFUENTE, M.J.; GANCEDO, C.; JAUNIAUX, J.C.; GANCEDO, J.M. Mth1 receives the signal given by the glucose sensors Snf3 and Rgt2 in *Saccharomyces cerevisiae*. **Mol. Microbiol.**, v. 35, p. 161-172, 2000.

LANDO, D.; GORMAN, J.; WHITELAW, M.L.; PEET, D.J. Oxygen-dependent regulation of hypoxia-inducible factors by prolyl and asparaginyl hydroxylation. **Eur. J. Biochem.**, v. 270, p.781-790, 2003.

LEMAIRE, M.; WÉSOŁOWSKI-LOUVEL, M. Enolase and glycolytic flux play a role in the regulation of the glucose permease gene *RAG1* of *Kluyveromyces lactis*. **Genetics.**, v. 168 p. 723-31, 2004.

LEMMON, S.K.; TRAUB, L.M. Sorting in the endosomal system in yeast and animal cells. **Curr. Opin. Cell Biol.**, v. 12, p. 457-466, 2000.

LIANG, H.; GABER, R.F. A novel signal transduction pathway in *Saccharomyces cerevisiae* defined by Snf3-regulated expression of HXT6. **Mol. Biol. Cell.**, v. 7, p. 1953, 1996.

LIN, S. S.; MANCHESTER, J. K.; GORDON, J. I. Sip2, an N-myristoylated beta subunit of Snf1 kinase, regulates aging in *Saccharomyces cerevisiae* by affecting cellular histone kinase activity, recombination at rDNA loci, and silencing. **J. Biol. Chem.**, v. 278, p. 13390-13397, 2003.

LIU, X.F.; CULOTTA, V.C. Mutational analysis of *Saccharomyces cerevisiae* Snf1p, a member of the Nramp family of metal transporters. **J. Mol. Biol.**, v. 289, p. 885-891, 1999.

LOSKO, S.; KOPP, F.; KRANZ, A.; KOLLING, R. Uptake of the ATP-binding cassette (ABC) transporter Ste6 into the yeast vacuole is blocked in the *doa4* mutant, **Mol. Biol. Cell**, v. 12, p. 1047-1059, 2001.

LUHTALA, N.; ODORIZZI, G. Bro1 coordinates deubiquitination in the multivesicular body pathway by recruiting Doa4 to endosomes. **J. Cell Biol.**, v. 166, p. 717-729, 2004.

MATERN, H.; HOLZER, H. Catabolite inactivation of the galactose uptake system. **J. Biol. Chem.**, v. 252, p. 6399-6402, 1977.

MAWSON, A.J. Bioconversions for whey utilization and waste abatement. **Bioresour. Technol.**, v. 47, p. 195-203, 1994.

MEDINTZ, I.; JIANG, H.; MICHELS, C.A. The role of ubiquitin conjugation in glucose-induced proteolysis of *Saccharomyces* maltose permease. **J. Biol. Chem.**, v. 273, p. 34454-34462, 1998.

MEDINTZ, I.; WANG, X.; HRADEK, T.; MICHELS, C.A. A PEST-like sequence in the N-terminal cytoplasmic domain of *Saccharomyces* maltose permease is required for glucose-induced proteolysis and rapid inactivation of transport activity. **Biochem**, v. 39, p. 4518-4526, 2000.

MEYER, J.; WALKER-JONAH, A.; HOLLENBERG, C. P. Galactokinase encoded by *GAL1* is a bifunctional protein required for induction of the *GAL* genes in *Kluyveromyces lactis* and is able to suppress the *gal3* phenotype in *Saccharomyces cerevisiae*. **Molecular Cell Biology**, v.11, p. 5454-5461, 1991.

MILKOWSKI, C.; KRAMPE, S.; WEIRICH, J.; HASSE, V.; BREUNIG, K.D. Feedback Regulation of Glucose Transporter Gene Transcription in *Kluyveromyces lactis* by Glucose Uptake. **J. Bacteriol.**, v. 183, p. 5223-5229, 2001.

MORENO, F.; HERRERO, P. The hexokinase 2-dependent glucose signal transduction pathway of *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Microbiol. Review**, v. 26, p. 83-90, 2002.

MORIYA, H.; JOHNSTON, M. Glucose sensing and signaling in *Saccharomyces cerevisiae* through the Rgt2 glucose sensor and casein kinase I. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 101, p. 1572-1577, 2004.

NATH, N.; MCCARTNEY, R. R.; SCHMIDT, M. C. Yeast Pak1 kinase associates with and activates Snf1. **Mol. Cell. Biol.**, v. 23, p. 3909-3917, 2003.

NEHLIN, J. O.; RONNE, H. Yeast MIG1 repressor is related to the mammalian early growth response and Wilms' tumour finger proteins. **The EMBO J.**, v. 9, 2891-2898, 1990.

NIKKO, E.; MARINI, A.M.; ANDRE, B. Permease recycling and ubiquitination status reveal a particular role for Bro1 in the multivesicular body pathway. **J. Biol. Chem.**, v. 278, p. 50732-50473, 2003.

ODORIZZI, G.; KATZMANN, D.J.; BABST, M.; AUDHYA, A.; EMR, S.D. Bro1 is an endosome-associated protein that functions in the MVB pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. **J. Cell Sci.**, v. 116, p. 1893-1903, 2003.

OSTLING, J.; CARLBERG, M.; RONNE, H. Functional domains in the Mig1 repressor. **Mol. Cell Biol.**, v. 16, p. 753-761, 1996.

OTTERSTEDT, K.; LARSSON, C.; BILL, R.M.; STAHLBERG, A.; BOLES, E.; HOHMANN, S.; GUSTAFSSON, L. Switching the mode of metabolism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **EMBO reports** v. 5, p. 532-537, 2004.

OZCAN, S.; DOVER, J.; JOHNSTON, M. Glucose sensing and signaling by two glucose receptors in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **EMBO J.**, v. 17, p. 2566-2573, 1998.

OZCAN, S.; DOVER, J.; ROSENWALD, A.G.; WOLFL, S.; JOHNSTON, M. Two glucose transporters in *S. cerevisiae* are glucose sensors that generate a signal for induction of gene expression. **Proc. Natl. Acad. Sci., USA**, v. 93, p. 12428-12432, 1996.

OZCAN, S.; JOHNSTON, M. Three different regulatory mechanisms enable yeast hexose transporter (HXT) genes to be induced by different levels of glucose. **Mol. Cell Biol.**, v. 15, p. 1564-1572, 1995.

PALOMINO, A.; HERRERO, P.; MORENO, F. Tpk3 and Snf1 protein kinases regulate Rgt1 association with *Saccharomyces cerevisiae* HXK2 promoter. **Nucleic Acids Res.**, v. 34, p. 1427-1438, 2006.

PANEK, H. R.; STEPP, J. D.; ENGLE, H.M.; MARKS, K. M.; TAN, P.K.; LEMMON, S. K.; ROBINSON, L.C. Suppressors of YCK-encoded yeast casein kinase 1 deficiency define the four subunits of a novel clathrin APlike complex. **EMBO J.**, v. 16, p. 4194-4204, 1997.

PELHAM, H.R. Membrane traffic: GGAs sort ubiquitin. **Curr. Biol.**, v. 14, p. 357-359, 2004.

PICKART, C.M. Targeting of substrates to the 26S proteasome. **FASEB J.**, v. 11, p. 1055-1066, 1997.

PIPER, R.C.; BRYANT, N.J.; STEVENS, T.H. The membrane protein alkaline phosphatase is delivered to the vacuole by a route that is distinct from the VPS-dependent pathway. **J. Cell Biol.**, v. 138, p. 531-545, 1997.

PLEMPER, R.K.; WOLF, D.H. Retrograde protein translocation: ERADication of secretory proteins in health and disease. **Trends Biochem. Sci.**, v. 24, p. 266-270, 1999.

POYTON, R. O. Models for oxygen sensing in yeast: implications for oxygen-regulated gene expression in higher eukaryotes. **Respir. Physiol.**, v. 115, p. 119-133, 1999

PRICE, A.; WICKNER, W.; UNGERMANN, C. Proteins needed for vesicle budding from the Golgi complex are also required for the docking step of homotypic vacuole fusion. **J. Cell Biol.**, v. 148, p. 1223-229, 2000.

PRIOR, C.; MAMESSIER, P.; FUKUHARA, H.; CHEN X.J.; WESOLOWSKI-LOUVEL, M. The hexokinase gene is required for transcriptional regulation of the glucose transporter gene *RAG1* in *Kluyveromyces lactis*. **Mol. Cell. Biol.** 13, 3882-3889, 1993.

PUERTOLLANO, R.; BONIFACINO, J.S. Interactions of GGA3 with the ubiquitin sorting machinery. **Nat. Cell Biol.**, n. 6, p. 244-251, 2004.

RAIBORG, C.; RUSTEN, T.E.; STENMARK, H. Protein sorting into multivesicular endosomes. **Curr. Opin Cell Biol.**, v. 15, p. 446-455, 2003.

RANDEZ-GIL, F.; HERRERO, P.; SANZ, P.; PRIETO, J. A.; MORENO, F. Hexokinase PII has a double cytosolic-nuclear localisation in *Saccharomyces cerevisiae* **FEBS Letters**, v. 425, p. 475-478, 1998.

RANDEZ-GIL, F.; SANZ, P.; ENTIAN, K. D.; AND PRIETO, J. A. Carbon source-dependent phosphorylation of hexokinase PII and its role in the glucose-signaling response in yeast. **Mol. Cell Biol.**, v. 18, p. 2940-2948, 1998.

RAPIN, J.D.; MARISON, I.W.; STOCKAR, U.V.; REILLY, J.P. Glycerol production by yeast fermentation of whey permeate. **Enzyme Microb. Technol.**, v. 16, p. 143-149, 1994.

REIFENBERGER, E.; FREIDEL, K.; CIRIACY, M. Identification of novel HXT genes in *Saccharomyces cerevisiae* reveals the impact of individual hexose transporters on glycolytic flux. **Mol. Microbiol.**, v. 16, p. 157-167, 1995.

ROBERG, K. J.; ROWLEY, N.; KAISER, C. A. Physiological regulation of membrane protein sorting late in the secretory pathway of *Saccharomyces cerevisiae*. **The Journal of Cell Biology**, v. 137, n. 7, p. 1469-1482, 1997.

RODRÍGUEZ, A.; DE LA CERA, T.; HERRERO, P.; MORENO, F. The hexokinase 2 protein regulates the expression of the *GLK1*, *HXK1* and *HXK2* genes of *Saccharomyces cerevisiae* **Biochem. J.**, v. 355, p. 625-631, 2001.

ROLLAND, F.; DE WINDE, J.H.; LEMAIRE K.; BOLES, E.; THEVELEIN, J.M.; WINDERICKX, J. Glucose-induced cAMP signalling in yeast requires both a G-protein coupled receptor system for extracellular glucose detection and a separable hexose kinase-dependent sensing process. **Mol. Microbial**, v. 38, p. 348-358, 2000.

ROLLAND, S.; HNATOVA, M.; LEMAIRE, LEAL-SANCHEZ, J.; WÉSOŁOWSKI-LOUVEL, M. Connection between the Rag4 glucose sensor and the KIRgt1 repressor in *Kluyveromyces lactis*. **Genetics**, v. 174, n. 2, p. 617-626, 2006.

SCHAFFRATH, R.; BREUNIG, K.D. Genetics and molecular physiology of the yeast *Kluyveromyces lactis*. *Fungal Genet Biol.*, v. 30 n.3, p. 173-190, 2000

SCHMIDT, M.C.; MCCARTNEY, R.R.; ZHANG, X.; TILLMAN, T.S.; SOLIMEO, H.; WOLFL, S.; ALMONTE, C.; WATKINS, S.C. Std1 and Mth1 proteins interact with the glucose sensors to control glucose-regulated gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. **Mol. Cell. Biol.**, v. 19, p. 4561-4571, 1999.

SCHULTE, F.; WIECZORKE, R.; HOLLENBERG, C.P.; BOLES, E. The *HTR1* gene is a dominant negative mutant allele of MTH1 and blocks Snf3- and Rgt2-dependent glucose signaling in yeast. **J. Bacteriol.**, v. 182, p. 540-542, 2000.

SHIFLETT, S.L.; WARD, D.M.; HUYNH, D. M.; VAUGHN, B.; SIMMONS, J.C.; KAPLAN, J. Characterization of Vta1p, a class E Vps protein in *Saccharomyces cerevisiae*, **J. Biol. Chem.**, v. 279, p. 10982-10990, 2004.

SHIH, S.C.; KATZMANN, D.J.; SCHNELL, J.D.; SUTANTO, M.; EMR, S.D.; HICKE, L. Epsins and Vps27p/Hrs contain ubiquitin-binding domains that function in receptor endocytosis. **Nat. Cell Biol.**, v. 4, p. 389-393, 2002.

SILVEIRA, W.B.; PASSOS, F.J.V.; MANTOVANI, H.C.; PASSOS, F.M.L. Ethanol production from cheese whey permeate by *Kluyveromyces marxianus* UFV-3: a flux analysis of oxido-reductive metabolism as a function of a lactose concentration and oxygen levels. **Enzyme Microb. Technol.**, v. 36, p. 930-936, 2005

SISO, M.I.G. The biotechnological utilization of cheese whey: a review. **Bioresour. Technol.**, v. 57, p. 1-11, 1996 .

SISO, M.I.G.; RAMIL, E.; CERDÁN, M.E.; FREIRE-PICOS, M.A. Respirofermentative metabolism in *Kluyveromyces lactis*: Ethanol production and the Crabtree effect. **Enzyme Microb. Technol.**, 18, 585-591, 1996

SISO, M.I.G.; FREIRE-PICOS, M.A.; RAMIL, E.; GONZÁLES-DOMÍNGUEZ, M.; TORRES, A. R.; CERDÁN, M.E.; Respirofermentative metabolism in *Kluyveromyces lactis*: insights and perspectives. **Enzyme Microb. Technol.**, v. 26, p. 699-705, 2000

STEPP, J. D.; HUANG, K. S.; LEMMON, K. The yeast adaptor protein complex, AP-3, is essential for the efficient delivery of alkaline phosphatase by the alternate pathway to the vacuole. **J. Cell Biol.**, v. 139, p. 761-1774, 1997.

SUTHERLAND, C. M.; HAWLEY, S. A.; MCCARTNEY R. R.; LEECH, A.; STARK, M. J.; SCHMIDT, M. C.; HARDIE, D. G. Elm1p is one of three upstream kinases for the *Saccharomyces cerevisiae* SNF1 complex. **Curr. Biol.**, v. 13, p. 1299-1305, 2003.

TEO, H.; PERISIC, O.; GONZALEZ, B.; WILLIAMS, R.L. ESCRT-II, an endosome-associated complex required for protein sorting: crystal structure and interactions with ESCRT-III and membranes. **Dev. Cell**, v. 7, p. 559-569, 2004.

TREITEL, M. A.; KUCHIN, S.; CARLSON, M. Snf1 protein kinase regulates phosphorylation of the Mig1 repressor in *Saccharomyces cerevisiae*. **Mol. Cell Biol.**, v. 18, p. 6273-6280, 1998.

VAGNOLI, P.; COONS, D.M.; BISSON, L.F. The C-terminal domain of Snf3p mediates glucose-responsive signal transduction in *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 160, p. 31-36, 1998.

VERSELE, M.; DE WINDE, J.H.; THEVELEIN, J.M. A novel regulator of G protein signalling in yeast, Rgs2, downregulates glucose-activation of the cAMP pathway through direct inhibition of Gpa2. **EMBO J.**, v. 18, p. 5577-5591, 1999.

VINCENT, O.; CARLSON, M. Gal83 mediates the interaction of the Snf1 kinase complex with the transcription activator Sip4. **EMBO J.**, v. 18, p. 6672-6681, 1999.

VINCENT, O.; CARLSON, M. Sip4, a snf1 kinase-dependent transcriptional activator, binds to the carbon source-responsive element of gluconeogenic genes. **EMBO J.**, v. 17, p. 7002-7008, 1998.

VINCENT, O.; TOWNLEY, R.; KUCHIN, S.; CARLSON M. Subcellular localization of the Snf1 kinase is regulated by specific subunits and a novel glucose signaling mechanism. **Genes Development**, v. 15, p. 1104-1114, 2001.

VOLLENBROICH, V.; MEYER, J.; ENGELS, R.; CARDINALI, G.; MENEZES, R.A.; HOLLENBERG, C.P. Galactose induction in yeast involves association of Gal80p with Gal1p or Gal3p. **Mol. Gen. Genet.** v. 261, p. 495-507, 1999.

WEBSTER, T.D.; DICKSON, R.C. The organization and transcription of the galactose gene cluster of *Kluyveromyces lactis*. **Nucleic Acids Research**, v. 16, p. 8011-8028, 1988.

WÉSOŁOWSKI–LOUVEL, M.; BREUNIG, K. D.; FUKUHARA, H. *Kluyveromyces lactis*. In: WOLF, K. (Ed.). **Non-conventional yeasts in biotechnology**. Heidelberg: Springer–Verlag, 1996. p.139-201.

WIEDEMUTH, C.; BREUNIG, K.D. Role of Snf1p in regulation of intracellular sorting of the lactose and galactose transporter Lac12p in *Kluyveromyces lactis*. **Eukaryot. Cell** v. 4, n. 4, p. 716-721, 2005

WILSON, W. A.; HAWLEY, S. A.; HARDIE, D. G. Glucose repression/derepression in budding yeast: SNF1 protein kinase is activated by phosphorylation under derepressing conditions, and this correlates with a high AMP: ATP ratio. **Curr. Biol.**, v. 6, p. 1426-1434, 1996.

WURMSER, A. E.; SATO, T.K.; EMR, S.D. New component of the vacuolar class C-Vps complex couples nucleotide exchange on the Ypt7 GTPase to SNARE-dependent docking and fusion, **J. Cell Biol.**, v. 151, p. 551-562, 2002.

YE, L.; KRUCKEBERG, A. L.; BERDEN, J. A.; VAN DAM, K. Growth and glucose repression are controlled by glucose transport in *Saccharomyces cerevisiae* cells containing only one glucose transporter. **J. Bacteriol.** v. 181, p. 4673-4675, 1999

YOUNG, E. T.; DOMBEK, K. M.; TACHIBANA, C.; IDEKER, T. Multiple pathways are co-regulated by the protein kinase Snf1 and the transcription factors Adr1 and Cat8. **J. Biol. Chem.**, v. 278, p. 26146-26158, 2003.

ZACHARIAE, W.; BREUNIG, K.D. Expression of the transcriptional activator LAC9 (KIGAL4) in *Kluyveromyces lactis* is controlled by autoregulation. **Molecular Cell Biology**, v. 13, p. 3058-3066, 1993.

ZENKE, F.; ZACHARIAE, W.; LUNKES, A.; BREUNIG, K. D. Gal80 proteins of *Kluyveromyces lactis* and *Saccharomyces cerevisiae* are highly conserved but contribute differently to glucose repression of the galactose regulon. **Molecular Cell Biology**, v. 13, p. 7566-7576, 1993.

ZENKE, F.T.; ENGLER, R.; VOLLENBROICH, V.; MEYER, J.; HOLLENBERG, C. P.; BREUNIG, K. D. Activation of Gal4p by galactose-dependent interaction of galactokinase and Gal80p. **Science**, v. 272, p. 1662-1665, 1996.

ZENKE, F.T.; KAPP, L.; BREUNIG, K.D. Regulated phosphorylation of the Gal4p inhibitor Gal80p of *Kluyveromyces lactis* revealed by mutational analysis. **Biol. Chem.**, v. 380, p. 419-430, 1993.

ZHANG, L.; GUARENTE, L. HAP1 is nuclear but is bound to a cellular factor in the absence of heme. **J. Biol. Chem.**, v. 269, p. 14643-14647, 1994.

ZITOMER, R.S.; LOWRY, C.V. Regulation of gene expression by oxygen in *Saccharomyces cerevisiae*. **Microbiol. Rev.** v. 56, p. 1-11, 1992.

ZITOMER, R.S.; LIMBACH, M.P.; RODRÍGUEZ-TORRES, A.M.; BALASUBRAMANIAN, B.; DECKERT, J.; NOW, P.M. Approaches to the study of Rox1 repression of the hypoxic genes in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Methods** v. 11, p. 279–288, 1997.

CAPÍTULO 2

Influence of carbon source, oxygen level and *snf1* mutation on the subcellular localization of Lac12GFP permease in *Kluyveromyces lactis*

Silveira, WB^{1,2} Passos, FML² and Breunig KD¹

¹ Institut für Genetik, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Halle, Germany

² Departamento de Microbiologia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Brazil

ABSTRACT

In this work we analyzed the influence of the carbon source, oxygen level and *snf1* mutation on the subcellular localization of Lac12GFP permease. Initially we have shown that *K. lactis* has higher affinity for lactose than for glucose. Our data suggest that the KISnf1p-dependent subcellular localization of Lac12GFP permease was not affected by glucose. Furthermore, we have observed that the subcellular localization of this permease in stationary phase was around the vacuole or at the vacuolar membrane. However when *K. lactis* was either grown on galactose or glucose in stationary phase the lactose permease seemed to be localized inside vacuole. These results indicate that the subcellular localization of lactose permease is carbon source dependent. The mRNA levels of the *LAC12GFP* gene expressed from constitutive promoter *ADH1* were similar on JA6 wild type and JSD1 (*Klsnf1* mutant), indicating that KISnf1p markedly

affects the LAC12GFP only at post-translational level. Analysis of the subcellular localization of lactose permease in *Klsnf1* mutant has shown that the permease is found intracellularly at vacuole membrane, suggesting that Klsnf1p may be involved in the lactose permease translocation into vacuole. In hypoxic condition, more lactose permease was localized at the plasma membrane up to 3 hours of growth comparing to normoxic conditions, indicating that the oxygen availability influences the localization of Lac12GFPp. Finally it was also demonstrated that both specific lactose consumption rate and ethanol production rate were higher in hypoxia than in normoxia, suggesting a link between lactose uptake and fermentative metabolism.

Key words: *Kluyveromyces lactis*, lactose, permease localization, oxygen level, fermentative metabolism

1. INTRODUCTION

In most human populations the ability to hydrolyse the glucose-galactose disaccharide lactose is restricted to early childhood and the genetic trait of lactose utilisation in adulthood is a recent adaptation to agricultural life-style that apparently occurred only 7000 years ago in the European population. Among microorganisms lactose catabolism is widespread among eubacteria but rare among fungi. While lactose metabolic genes are found in a few fungal genomes such genes are absent in most species. Comparative genome analysis indicated that not only lactose but also galactose metabolic genes degenerated rapidly during evolution and this gene loss occurred independently in several branches of the phylogenetic tree (Hittinger et al 2004). Thus, for unknown reasons the ability to metabolize lactose seems to be subject to negative selection in eukaryotic evolution.

Molecular analysis of fungal lactose utilisation is most advanced in *Kluyveromyces lactis*, one of the major yeasts in dairy products. Two linked genes (*LAC* genes) *LAC4* and *LAC12*, encoding eukaryotic β -galactosidase and lactose permease, respectively, not present in the genome of the model organism *Saccharomyces cerevisiae* are sufficient to explain why *K. lactis* can grow on lactose whereas *S. cerevisiae* can not. The *LAC4* and *LAC12* genes are located at a subtelomeric position on chromosome and are divergently transcribed (Gödecke et al 1991). The expression of those genes is tightly controlled at the level of transcription and the molecular basis of this

LAC gene regulation have been extensively studied (Breunig and Kuger 1987, Ruzzi et al 1987, Leonardo et al 1987, Gödecke et al 1991, Zenke et al 1996).

Lactose metabolism is co-regulated with galactose metabolism at the transcriptional level. The galactose metabolic genes (*GAL* genes), encoding enzymes of the Leloir pathway that converts galactose to glucose-6-phosphate in *K. lactis* are very similar to those of *S. cerevisiae*. Induction by lactose requires lactose uptake and β -galactosidase activity, while galactose induction can occur when the *lac4* and *lac12* genes are mutated. The inducing metabolite is intracellular galactose, which causes activation of Lac9/KIGal4, an ortholog of the well known transcription activator Gal4 in *S. cerevisiae* (Ruzzi et al 1987, Wray, Salmeron et al 1989, Kuger et al 1990). The activation of KIGal4 by galactose requires the galactokinase KIGal1, which catalyses the first step in galactose metabolism. However, the catalytic activity of KIGal1 is not required. Instead, the KIGal1 protein has a second, regulatory function by interacting with the KIGal4 inhibitor KIGal80 (Meyer, Zenke et al 1993, Zenke et al 1996). KIGal1-KIGal80 interaction requires binding of the substrates galactokinase substrates galactose and ATP and competes with KIGal4-KIGal80 interaction thus leading to activation of KIGal4 in response to galactose (Anders et al 2006).

Studies in *Saccharomyces cerevisiae* and humans have shown that uptake and metabolism of galactose have to be carefully coordinated. Impairment of the Leloir enzymes galactose-1-phosphate uridylyltransferase ("transferase", Gal7p, EC 2.7.1.6) or UDP-galactose 4'-epimerase ("epimerase", Gal10p, EC 5.1.3.2) in yeast cause growth arrest in the presence of even trace amount of galactose (Wasilenko and Fridovich-Keil 2006). In humans such genetic disorders cause galactosemia. It is assumed that intracellular accumulation of galactose-1-phosphate is toxic but the molecular details of this toxicity are not understood. Since galactose is released intracellular by upon hydrolysis of lactose it is expected that lactose uptake and hydrolysis must not exceed galactose metabolic activity.

Recently, comparison of a wild type *K. lactis* strain with an industrial strain has revealed considerable differences with respect to regulation of lactose permease (Suleau et al, 2005, Suleau et al, 2006). Based on marked

global changes in the transcriptome with little evidence for molecular diversity between those strains these authors suggested that remodelling of transcriptional circuits represents a major evolutive adaptation strategy in *K. lactis*. The finding that *LAC12* gene regulation is not correlated in all strains with *LAC4* gene regulation suggests that specific regulators exist for Lac12. These may affect transcription unidirectionally from the large intergenic region between *LAC4* and *LAC12*. Alternatively or additionally, post-transcriptional regulatory mechanisms may also exist. Evidence for post-translational control of Lac12 intracellular localisation by the Snf1 kinase was recently presented (Wiedemuth and Breunig 2005).

In contrast to *S. cerevisiae*, *K. lactis* does not fully exploit its uptake capacity during respiratory growth (Milkowski et al 2001). In last years several experiments have supported the idea that the sugar transport step is very important in the glycolytic flux control, which in turn controls the respiratory and fermentative flux (Ye et al 1999, Elbing et al 2004, Otterstedt et al 2004). It has been observed that the strain of *S. cerevisiae*, in which glucose transport occurs as a function of chimeric transporter composed by Hxt1p (low affinity transporter) and Hxt7p (high affinity transporter), grows exclusively respiratory metabolism in aerobic conditions. These results suggest that sugar transport has a central role in the decision between fermentative and respiratory metabolism (Otterstedt et al 2004). These authors also observed that in anaerobic conditions the strain switches to fermentative metabolism. Silveira et al 2005 have appointed that oxygen availability has a definitive role on lactose consumption rate in a wild type strain classified as *Kluyveromyces marxianus* isolated.

In this work we evaluated the influence of carbon source, *Klsnf1* mutation and oxygen level on lactose permease localization. In trying to separate the influence of Snf1 on *LAC* gene expression from post-translational effects we have expressed a Lac12-GFP fusion protein constitutively from a Snf1 independent promoter. Here we show that the lactose permease localization is dependent of carbon source and oxygen level. In *Klsnf1* mutant the permease was localized at vacuole membrane. Finally we showed that Klsnf1p affect the LAC12EGFP expression markedly only at post-translational level

2. MATERIAL AND METHODS

2.1. Strains and growth conditions

The strains used in this work are listed on table 1. The *K. lactis* wild type strain strain (JA6) and *Klsnf1* mutant (JSD1) were transformed with the centromeric plasmid pCAL12EGFP originating the strains JA6-pCAL12EGFP and JSD1-pCAL12EGFP, respectively. Cells were grown in synthetic medium (SC) (0.67% yeast nitrogen base with amino acids and nucleobases) (Sherman 1990) with and without tryptophan containing the indicated carbon sources. In hypoxia experiments, nitrogen gas (99%, v/v, purity) was purged into the culture medium for 30 min after inoculation. The specific growth rates (μ) were determined by linear regression of the plot $\ln A_{600}$ versus time (h) at glucose concentrations ranging from 0.68 to 444.44 mmol L⁻¹ or at lactose concentration ranging from 0.36 to 230 mmol.L⁻¹. The kinetic growth constants (maximum growth rate (μ_{max}) and saturation Constant (Ks)) were determined using Sigma Plot program.

Table 1 – List of strains of *K. lactis* used in this work

Strain	genotype	Reference
JA6	<i>MATα ade1-600 adeT600 ura3-12 trp1-11 LAC9-2</i>	Breunig and Kuger 1987
JSD1	<i>MATα ade1-600 adeT600 ura3-12 trp1-11 LAC9-2 snf1::ScURA3</i>	Dong and Dickson 1997
JA6LAC12GFP	<i>MATα ade1-600 adeT600 ura3-12 trp1-11 LAC9-2 LAC12-EGFP-ScURA3</i>	Wiedemuth and Breunig 2005
JSD1LAC12GFP	<i>MATα ade1-600 adeT600 ura3-12 trp1-11 LAC9-2 snf1::Scura3 LAC12-EGFP-ScURA3</i>	Wiedemuth and Breunig 2005

2.2. Construction of the pCAL12EGFP plasmid

An AflIII-BbVCI fragment (*LAC12GFP* fragment) of the episomal plasmid YEGFPLAC12 was linked to the centromeric plasmid pCAL12A digested with AflIII-BbVCI enzyme to create plasmid pCAL12EGFP. In this plasmid the *LAC12GFP* gene expression occurs constitutively (ADH1 promoter) and independently of the kinase KISnf1p.

2.3. Fluorescence microscopy analysis

The Lac12GFPp localization was analysed by fluorescence microscopy (Olympus microscopy) and (Zeiss Axioplan2e microscope equipped with a 6100 alpha-Plan Fluor objective and differential-interference-contrast). The FM4-64 dye (Molecular Probes, Eugene, OR) localization was analysed by Zeiss Axioplan2e microscope equipped with a 6100 alpha-Plan Fluor objective and differential-interference-contrast. The lipophilic dye FM4-64 was used to analyse the lactose permease localization at the vacuole membrane, since dye rapidly moves from the plasma membrane to vacuolar membrane. The cells were incubated with FM4-64 dye (10 $\mu\text{moles.L}^{-1}$) for 30 minutes and transferred to fresh medium without the dye.

2.4. Northern analysis

Total RNA was isolated by a hot acidic phenol procedure. Northern analysis was carried out as described (Alwine et al 1977). Five μg of RNA sample was loaded per lane. RNA was denatured in loading buffer containing 6% formaldehyde. Digoxigenin-labeled probes were prepared by PCR labeling with a DNA labeling kit (Roche). The digoxigeninlabeled bands were detected by chemiluminescence with disodium -3-{4-methoxyspiro [(1,2-dioxetane-3,2-(5-chloro) tricyclo (3.3.1.13,7)decan]4-yl}phenyl phosphate (Roche).

2.5. Analysis of sugar consumption and ethanol production

Quantitative determination of lactose and ethanol was carried out by high-performance liquid chromatography (HPLC), using an ion exclusion column Aminex HPX- 87H (Bio-Rad), kept at 60 °C. The eluant for separation was 5mM H_2SO_4 , applied at an elution rate of 0.7 mL min^{-1} . The column was coupled to the refractive index detector HP 1047 A.

3. RESULTS

3.1. *K. lactis* has a higher affinity for lactose than for glucose

As can be observed in Figure 1, *K. lactis* (JA6LAC12GFP) is able to assimilate both lactose and glucose concomitantly, suggesting that glucose repression effect is weak in this strain.

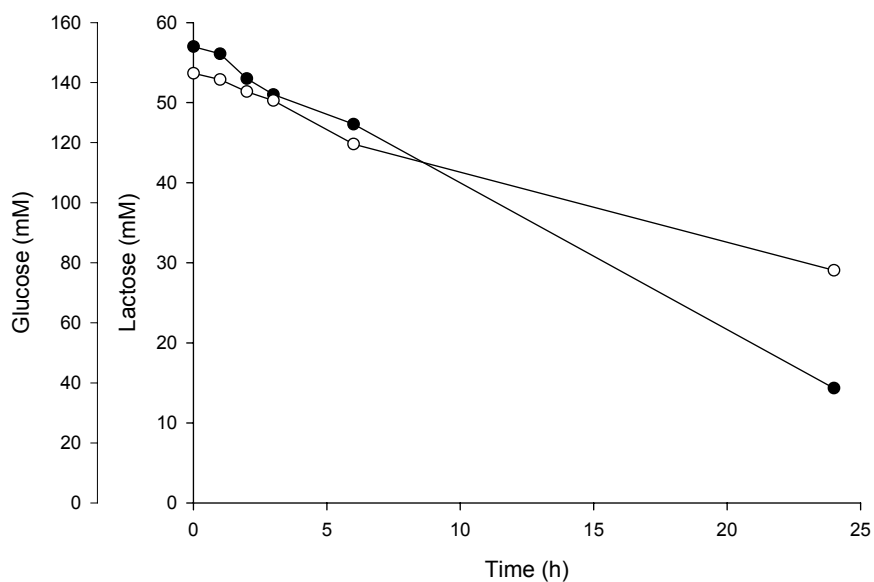


Figure 1 – Lactose and glucose consumption: The JA6LAC12GFP strain was grown on SC medium containing glucose 2% w/v ($142,11 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$) (○) plus lactose 2% w/v ($58,48 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$) (●).

In fact, the JA6LAC12GFP strain showed an affinity for lactose, approximately 7 times higher than for glucose (Figure 2). Furthermore, it was observed that the JA6LAC12GFP strain displayed an affinity for both sugars (lactose and glucose) higher than the *Klsnf1* mutant (JSD1LAC12GFP). The affinity difference observed between JA6LAC12GFP and JSD1LAC12GFP (*Klsnf1* mutant) was even more pronounced for lactose.

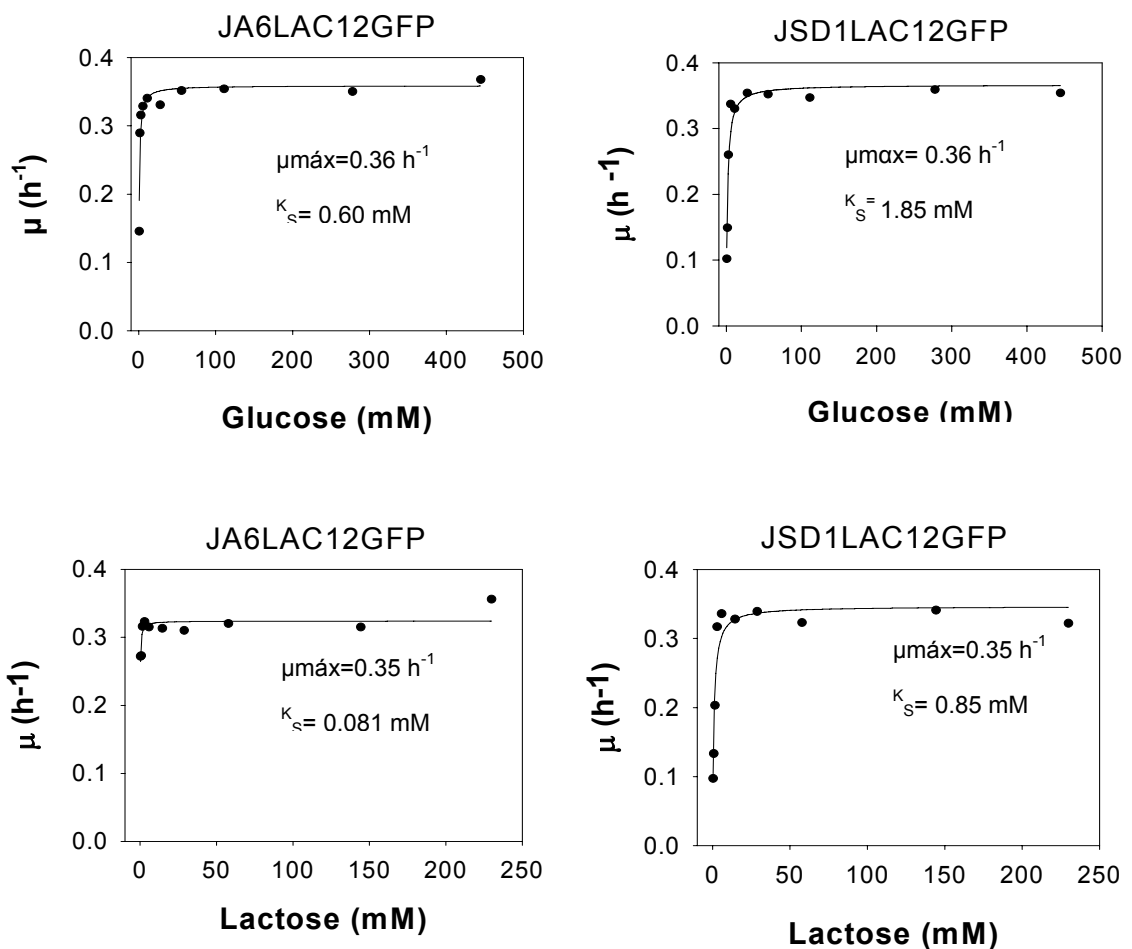


Figure 2 – Growth kinetic constants: The JA6LAC12GFP and JSD1LAC12GFP (*Klsnf1* mutant) strains were grown on SC medium containing glucose ranging from 0.68 to 444.44 mmoles-L^{-1} (mM) or lactose ranging from 0.36 to 230.00 mmoles-L^{-1} (mM).

3.2. Glucose does not affect the KISnf1p activity that is involved with the subcellular localization of LAC12GFP permease

Figure 3 reveals that the presence of glucose does not seem to affect the KISnf1p dependent subcellular localization of LAC12GFP permease, since the localization was similar between the growth on lactose and lactose plus glucose.

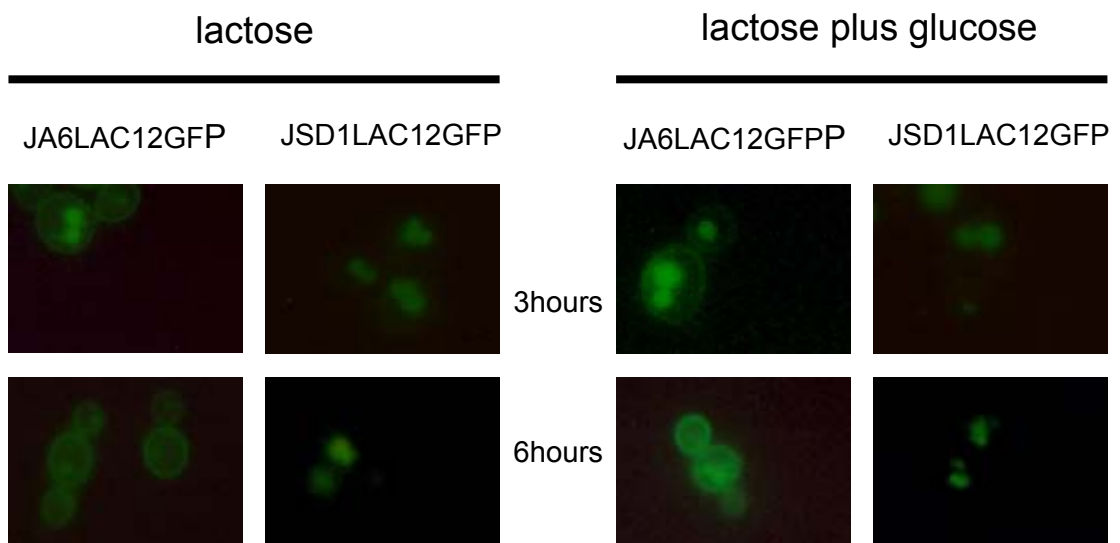


Figure 3 – Subcellular localization of LAC12GFPp: The (JA6LAC12GFP) and *Klsnf1* mutant (JSD1LAC12GFP) strains pre-grown on SC medium containing lactose 2% (w/v) were harvested and suspended on SC media containing lactose 2% (w/v) or lactose 2% (w/v) plus glucose 2% (w/v). The Lac12GFPp localization was analysed by fluorescence microscopy (Olympus microscopy)

3.3. LAC12GFP permease is localized around vacuole when *K. lactis* is grown overnight on lactose

The subcellular localization of Lac12GFP permease was similar when *K. lactis* was grown on both lactose and galactose for approximately 2 hours, however when the same strain was grown overnight on lactose the localization was different (Figure 4A and 4B). After overnight growth, the fluorescence signal at the plasma membrane was weaker when

JA6LAC12GFP was grown on lactose than on galactose as carbon source. Furthermore the Lac12GFPp does not seem to be localized inside the vacuole, but around it.

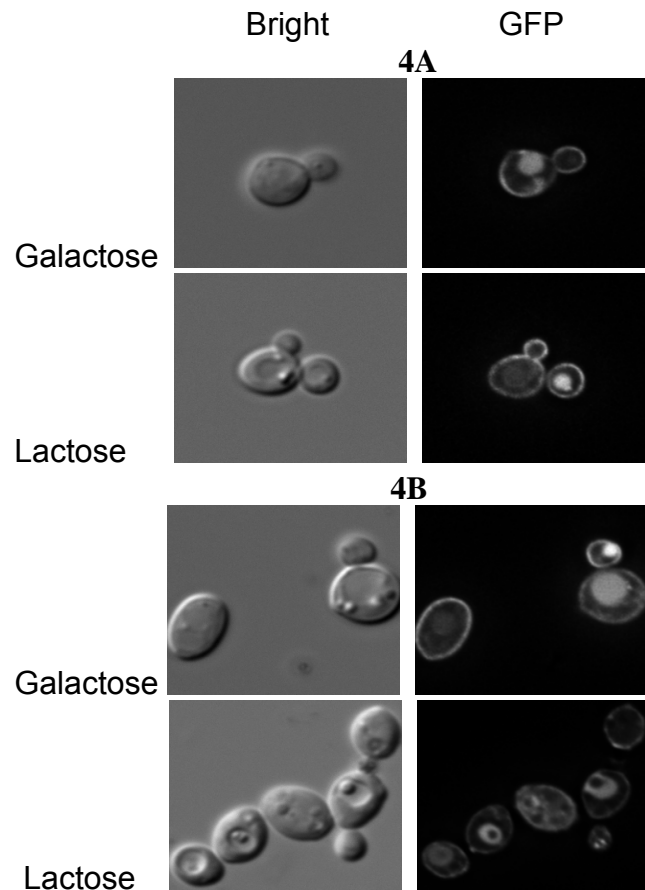


Figure 4 – Subcellular localization of LAC12GFPp when the JA6LAC12GFP strain was grown SC medium containing galactose or lactose as carbon source. 4A- After 2 hours of growth 4B- Overnight growth, The Lac12GFPp localization was analysed by fluorescence microscopy (Zeiss Axioplan2e microscope equipped with a 6100 alpha-Plan Fluor objective and differential-interference-contrast).

3.4. The subcellular localization of LAC12GFP permease is similar on both galactose and glucose

Because of the difference on Lac12GFPp localization when *K. lactis* has been cultured overnight on lactose compared to galactose, we

addressed the question whether Lac12GFPp is also differentially localized on other cell compartment when the yeast is grown on other carbon sources. For this reason we constructed the plasmid pCAL12EGFP in which the expression of *LAC12GFP* gene occurs constitutively. As it can be seen in Figure 5 the staining in vacuole was more pronounced when the wild type strain carrying plasmid pCAL12EGFP was grown on lactose medium than when grown on glucose medium.

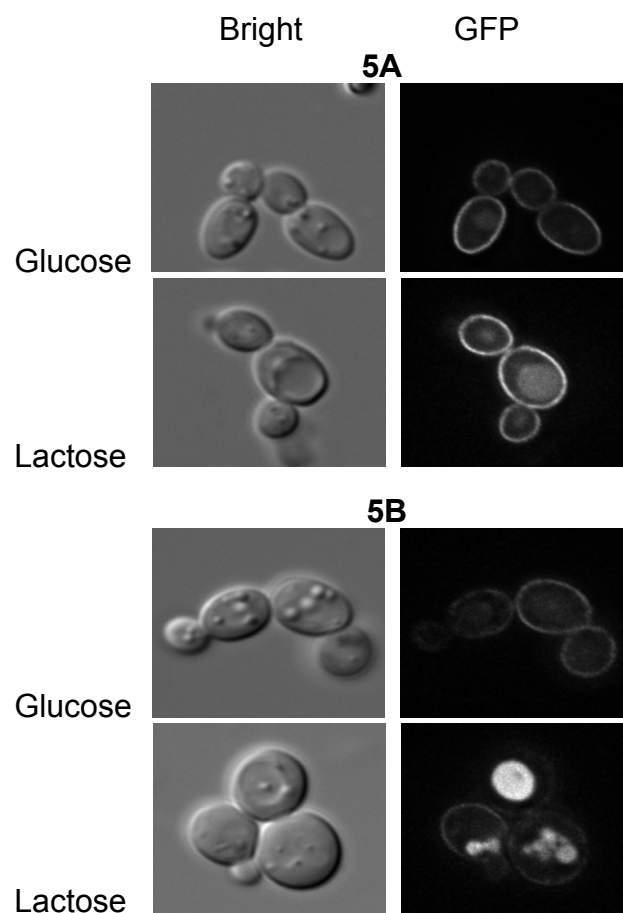


Figure 5 – Subcellular localization of LAC12GFPp when the JA6 strain carrying the pCAL12EGFP plasmid was grown on SC medium without tryptofhan containing glucose or lactose as carbon source. 2A- After 5 hours of growth 2B- Overnight growth. The Lac12GFPp localization was analysed by fluorescence microscopy (Zeiss Axioplan2e microscope equipped with a 6100 alpha-Plan Fluor objective and differential-interference-contrast).

Interestingly, it was also observed that more Lac12GFP permease in an intracellular compartment when the JA6 strain carrying the plasmid pCAL12EGFP was grown overnight on lactose than on glucose (Figure 5B). In overnight growth on lactose Lac12GFP permease seemed to be localized in some vesicle or around the vacuole.

3.5. LAC12GFPp is predominantly localized at vacuole membrane in *KlSnf1* mutant

In order to get more information about the intracellular Lac12GFPp localization in *KlSnf1* mutant, we used the lipophilic dye FM4-64, which moves rapidly from the plasma membrane to vacuolar membrane. The overlay image shows that Lac12GFPp co-localized with FM4-64 in *KlSnf1* mutant (JSD1) grown on glucose as carbon source, indicating that subcellular localization of LAC12GFPp was at vacuolar membrane. In JA6 strain the fluorescence signal was weaker inside the cell. Furthermore it was not observed co-localization with FM4-64 dye, indicating that *KlSnf1p* may be involved somehow with the lactose permease internalization to the vacuole lumen.

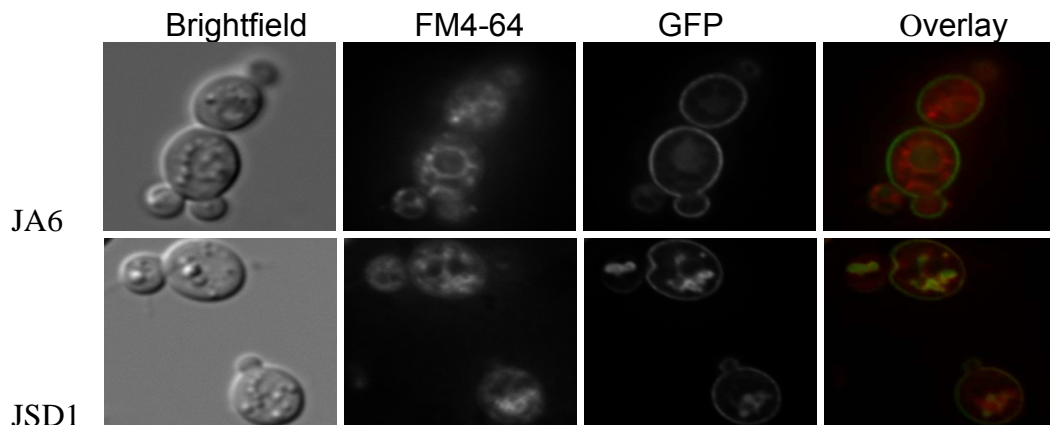


Figure 6 – Lac12GFPp is found inside (JA6) and vacuolar membrane (JSD1-*KlSnf1* mutant). *K. lactis* strain JA6 and JSD1 (*KlSnf1* mutant) carrying the pCAL12EGFP were grown on SC medium without tryptophan containing glucose 2% (w/v). The Lac12GFPp localization was analysed by fluorescence microscopy (Zeiss Axioplan2e microscope equipped with a 6100 alpha-Plan Fluor objective and differential-interference-contrast). The FM4-64 dye (Molecular Probes, Eugene, OR) localization was analysed by Zeiss Axioplan2e microscope equipped with a 6100 alpha-Plan Fluor objective and differential-interference-contrast.

3.6. KISnf1p markedly influences the *LAC12GFP* gene expression only at post-translational level

Because in the pCAL12EGFP plasmid the transcription of *LAC12EGFP* gene occurs constitutively from constitutive promoter *ADH1*, we can exclude the Snf1p influence on *LAC12GFP* transcription from *LAC* promoter. For this reason a northern blot was performed to investigate whether Snf1p is involved in *LAC12GFP* gene expression. The mRNA level was practically the same in JA6 and JSD1 (*Klsnf1* mutant) strains indicating that KISnf1p affect the *LAC12EGFP* expression markedly only at post translational level (Figure 7). As a control we probed total RNA with a *LAC4* probe, as expected no signal was observed because the strains were grown on SC medium containing glucose.

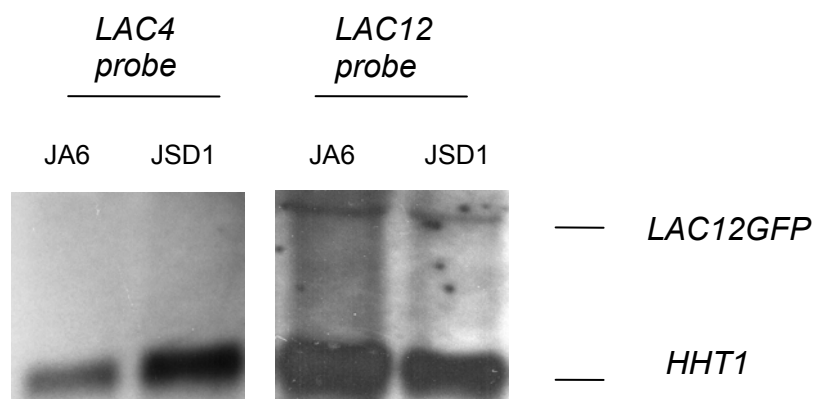


Figure 7 – Influence of the *K. lactis snf1* mutation on *LAC12GFP* gene expression examined by Northern Analysis of total RNA isolated from JA6 strain and congenic *Klsnf1* mutant (JSD1) carrying the plasmid pCAL12EGFP grown in glucose 2%(w/v). We probed 5 ug of total RNA with a digoxigenin-labeled *LAC4* and *HHT1* fragment or *LAC12* and *HHT1* fragment.

3.7. The oxygen level has a pronounced effect on LAC12GFPP localization

In order to evaluate the influence of oxygen level on lactose uptake, *K. lactis* was grown under normoxic and hypoxic conditions. Up to 3 hours of growth, the fluorescence signal at plasma membrane was stronger in hypoxia than normoxia, suggesting that under low oxygen level more permease is localized at plasma membrane.

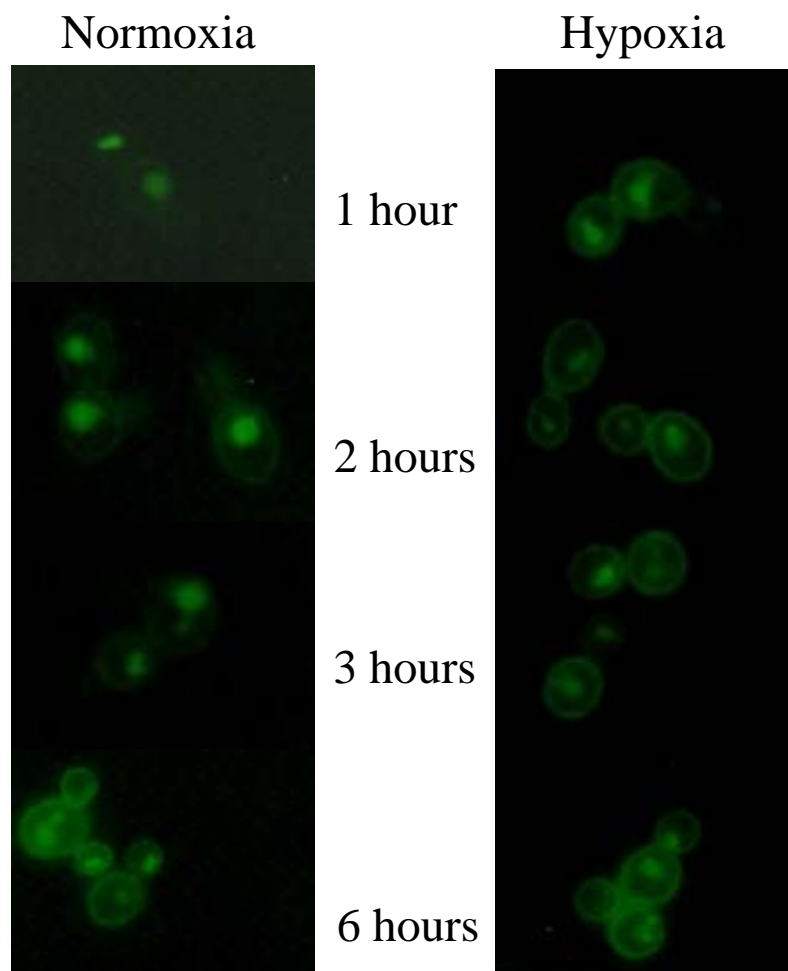


Figure 8 – Effect of oxygen level on the subcellular localization of LAC12GFPP in *K. lactis*. The strain JA6LAC12GFP was grown on SC medium containing lactose 2% (w/v) under normoxia and hypoxia. In hypoxic condition, nitrogen (99% v/v purity) was purged into the culture medium for 30 minutes after inoculation. The Lac12GFPP localization was analysed by fluorescence microscopy (Olympus microscopy)

The lactose consumption rate was higher in hypoxia than in normoxia, in agreement with the predominant localization of LAC12GFPp at plasma membrane under low oxygen level (Figure 9). Furthermore, the ethanol production rate was also higher in hypoxia, indicating that lactose uptake has marked effect on fermentative metabolism (Figure 9).

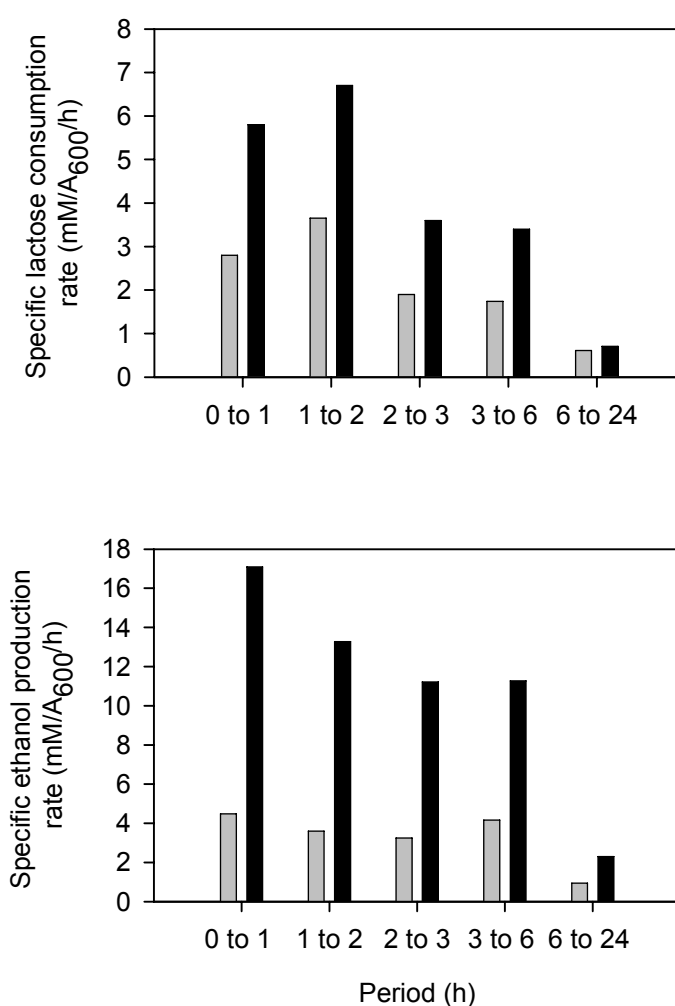


Figure 9 – Effect of oxygen level on the specific lactose consumption rate and ethanol production rate by *K. lactis*. The JA6LAC12GFP strain was grown on SC medium containing lactose 2% (w/v) under normoxia (■) and hypoxia (■). In hypoxic condition, nitrogen (99% v/v purity) was bulbed purged into the culture medium for 30 minutes after inoculation.

5. DISCUSSION

Kluyveromyces lactis has a low sensitivity to glucose repression and in some strains such as CBS 2360, the glucose repression is absent (Breunig et al 2000, Breunig and Schaffrat 2000). In opposite, *S. cerevisiae* is strongly sensitive to glucose repression. In fact, *S. cerevisiae* exhibits a marked preference for glucose. In this work we observed that *K. lactis* is able concomitantly to assimilate lactose as well as glucose. In *K. lactis* natural environment (dairy factories) lactose is the major sugar, although glucose and galactose also are found due to action of lactic acid bacteria that can also synthesize enzymes able to hydrolyze lactose. For this reason, it is not a surprise that *K. lactis* concomitantly utilizes both lactose and glucose. Nevertheless, our kinetic growth data show that *K. lactis* has higher affinity for lactose, suggesting that this sugar is the preferential carbon source for *K. lactis*. In *S. cerevisiae*, the serine/treonine kinase Snf1p regulates the expression of several genes, whose products are involved in carbon metabolism (Young et al 2003, Treitel et al 1998, (Vincent e Carlson 1999). Our kinetic growth data shows that the apparent affinity constants for both lactose and glucose decreased in *klsnf1* mutant compared to the wild type, indicating that also in *K. lactis* the Snf1p regulate the expression of genes, whose products are involved in the carbon metabolism.

Sugar transport plays a key role in regulating the central carbon metabolism in yeasts (Flores et al 2006). Although lactose is the major

carbon source in *K. lactis* environment, there is not much information about lactose permease regulation (Lac12p) at post transcriptional level. Recently, Wiedemuth and Breunig 2005 have shown that KISnf1p has an important role in stabilizing Lac12GFP permease at the plasma membrane. In order to verify whether glucose would affect the KISnf1p dependent subcellular localization of LAC12GFPp we have analyzed the subcellular localization of this permease in the presence of lactose plus glucose. Our data suggest that glucose does not affect the KISnf1p dependent subcellular localization of the LAC12GFPp.

In the present work, we also investigated the Lac12GFPp subcellular localization in response to different carbon sources and the role of KISnf1p on *LAC12* gene expression. Our results indicate that the subcellular localization of Lac12GFPp is carbon source dependent. Surprisingly, in *K. lactis* grown overnight on lactose the Lac12GFPp is localized in some vesicles or around the vacuole. In contrast, *K. lactis* grown overnight on both galactose and glucose the Lac12GFP seems to be localized inside the vacuole. This difference is intriguing because the lactose permease mediates both lactose and galactose uptake. Recently Baruffini et al 2006 showed that the high-affinity glucose carrier Hgt1p is also a high affinity-galactose carrier. Because of the difference on Lac12GFP permease localization, observed in stationary phase where the galactose concentration is low, we speculate that the role of Lac12p in galactose transport should be severely impaired and for this reason is targeted for degradation. On other hand lactose is transported exclusively by Lac12p, in other words, this permease is also responsible for the high affinity lactose uptake. Perhaps the subcellular localization of Lac12GFP permease in vesicles or around the vacuole, instead of inside the vacuole is related to the role of this permease in high affinity lactose uptake. Because the subcellular localization of Lac12GFP permease in stationary phase was similar on both glucose and galactose, we believe that lactose is the signal that leads the Lac12GFPp localization in vesicles or around vacuole.

As an attempt to separate the influence of Snf1 on *LAC* gene transcription from post-translational effects we have expressed a Lac12GFP fusion protein constitutively from a Snf1 independent promoter. We observed

that KISnf1p affects markedly the *LAC12GFP* expression only at post translational level, because the *LAC12GFP* mRNA level is not affected by the *Klsnf1* mutation. Although KISnf1p does not affect the *LAC12GFP* mRNA level, we can not exclude that KISnf1p could be involved with mRNA stability of other genes.

Another conclusion is that KISnf1p seems to be involved with the Lac12GFP permease translocation into the vacuole, because in *Klsnf1* mutant the permease was intracellularly localized at vacuole membrane. In *S. cerevisiae* it has been reported that the phosphorylation of permeases is needed for their subcellular localization. The mutation of the conserved serine/treonine residues present in N-terminal of maltose permease (Mal61p), led to maltose permease accumulation in pre-vacuole, indicating that the phosphorylation of those residues are crucial for Mal61p to reach the vacuole (Gadura e Michels 2006). Interestingly, the ScSnf1p/Sip1 subunit localizes at the vacuole membrane (Hedbacker, 2004). Although the role of ScSnf1p/Sip1 subunit at vacuole membrane is unknown it is reasonable to assume that this kinase may be involved with the subcellular localization of permeases. At the moment we can not precise whether in *K. lactis* the accumulation of the lactose permease at the vacuole membrane is directly or indirectly due to Klsnf1p on lactose permease or if its effect is indirect. Further studies need to be carried out to investigate whether KISnf1p acts directly on lactose permease or regulates other proteins that are involved with lactose permease translocation into the vacuole.

Sugar transport plays a key role in regulation of carbon metabolism and in the balance between respiration and fermentation (Suleau et al 2006). It has been thought that *K. lactis* does not exploit totally its transport capacity in aerobic conditions and thus the oxygen availability can influence the transport activity (Milkowski et al 2006). Our data shows that oxygen availability has a pronounced effect on subcellular localization of Lac12GFP permease, because more permease was found at the plasma membrane in hypoxia. The predominant presence of Lac12GFP permease at the plasma membrane may be due not only to post-translational regulation triggered by oxygen depletion, but also to a higher expression of *LAC12* gene or both. Further experiments could clarify these possibilities. Furthermore, the specific

lactose consumption rate and ethanol production rate were higher under low oxygen level, suggesting a link between sugar uptake and fermentative metabolism. Taken together, our results suggest that low oxygen levels favour a higher lactose uptake and higher fermentative flux in *K. lactis*.

6. REFERENCES

- Alwine, J. C. D.; Kemp, J. and Stark, G. R.** 1977. Method for detection of specific RNAs in agarose gels by transfer to diazobenzyloxymethyl-paper and hybridization with DNA probes. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **74**:5350-5354.
- Anders, A.; Lilie, H.; Franke, K.; Kapp, L.; Stelling, J.; Gilles, E.D. and Breunig, K.D.** (2006). The galactose switch in *Kluyveromyces lactis* depends on nuclear competition between Gal4 and Gal1 for Gal80 binding. *J. Biol. Chem.*, **281**(39): 29337-48.
- Baruffini, E.; Goffrini, P.; Donnnini, C. Lodi, T.** (2006). Galactose transport in *Kluyveromyces lactis*: major role of the glucose permease Hgt1. *FEMS Yeast Res.*, **6**, 1235-42.
- Breunig, K.D.; Kuge, P.** (1987). Functional homology between the yeast regulatory proteins GAL4 and LAC9: LAC9-mediated transcriptional activation in *Kluyveromyces lactis* involves protein binding to a regulatory sequence homologous to the GAL4 protein-binding site. *Mol. Cell Biol.*, **7**:4400-4406.
- Breunig, K.D.; Bolotin-Fukuhara, M., Bianchi, M.M.; Bourgarel, D.; Falcone, I. F.; Frontali, L.; Goffrini, P.; Krijger, J.J., Mazzoni, C.; Milkowski, C.; Steensma, H.Y.; Wésolowski-Louvel, M.; Zeeman, A.M.** (2000). Regulation of primary carbon metabolism in *Kluyveromyces lactis*. *Enzyme Microb. Technol.* **26**, 771-780.
- Dickson, R.C.; Barr, K.** (1983). Characterization of lactose transport in *Kluyveromyces lactis*. *J. Bacteriol.*, **154**:1245-51.

Elbing, K.; Larsson, C.; Bill, R.M.; Albers, E.; Snoep, J.L.; Boles, E.; Hohmann, S.; Gustafsson, L. (2004). Role of hexose transport in control of glycolytic flux in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**, 5323-5330.

Flores, C.L.; Rodriguez, C.; Petit, T.; Gancedo, C. (2000). Carbohydrate and energy yielding metabolism in non conventional yeasts. *FEMS Microbiol. Rev.* **24**, 507-529

Gadura, N.; Michels, C.A (2006). Sequences in the N-terminal cytoplasmic domain of *Saccharomyces cerevisiae* maltose permease are required for vacuolar degradation but not glucose-induced internalization. *Curr Genet* **50**: 101-114

Gödecke, A.; Zachariae, W.; Arvanitidis, A. and Breunig, K.D. (1991). Coregulation of the *Kluyveromyces lactis* lactose permease and beta-galactosidase genes is achieved by interaction of multiple LAC9 binding sites in a 2.6 kbp divergent promoter. *Nucl. Acids Res.*, **19**, 5351-5358.

Hedbacker, K.; Townley, T. and Carlson, M. (2004). Cyclic AMP-Dependent protein kinase regulates the subcellular localization of Snf1-Sip1 protein kinase. *Mol. Cell Biol.*, **24**(5): 1836-43.

Hittinger, C.T.; Rokas, A. and Carroll, S.B. (2004). Parallel inactivation of multiple GAL pathway genes and ecological diversification in yeasts. *Proc. Natl Acad. Sci.*, **101**(39):14144-9.

Leonardo, J.M.; Bhairi, S.M. and Dickson, R.C. (1987). Identification of upstream activator sequences that regulate induction of the beta-galactosidase gene in *Kluyveromyces lactis*. *Mol. Cell Biol.*, **7**(12):4369-76.

Kuger, P.; Godecke, A. and Breunig, K.D. (1990). A mutation in Zn-finger of the GAL4 homolog LAC9 results in glucose repression of its target genes. *Nucleic Acids Res.*, **25**;18(4): 745-51.

Milkowski, C.; Krampe, S.; Weirich, J.; Hasse, V.; Breunig, K.D. (2001). Feedback Regulation of Glucose Transporter Gene Transcription in *Kluyveromyces lactis* by Glucose Uptake. *J.Bacteriol.* **183**: 5223-5229.

Otterstedt, K.; Larsson, C.; Bill, R.M.; Stahlberg, A.; Boles, E.; Hohmann, S.; Gustafsson, L. (2004). Switching the mode of metabolism in the yeast *Sacharomyces cerevisiae* . *EMBO reports* **5**, 532-537.

Ross, K.L.; Davis, C.N. and Fridovich-Keil, J.L. (2004). Differential roles of the Leloir pathway enzymes and metabolites in defining galactose sensitivity in yeast. *Mol. Genet Metab.*, **83**(1-2): 103-16.

Ruzzi, M.; Breunig, K.D. and Ficca, A.G. (1987). Positive regulation of the beta-galactosidase gene from *Kluyveromyces lactis* is mediated by an upstream activation site that shows homology to the GAL upstream activation site of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell Biol.*, **7**(3):991-7.

Salmeron Jr., J.M.; Langdon, S.D. and Johnston, S.A. (1989). Interaction between transcriptional activator protein LAC9 and negative regulatory protein GAL80. *Mol. Cell Biol.*, **9**(7): 2950-6.

Schaffrath, R.; Breunig, K.D. (2000). Genetics and molecular physiology of the yeast *Kluyveromyces lactis*. *Fungal Genet Biol.*, **30**(3):173-190

Sherman, F. (1990). Guide to yeast genetics and molecular biology. Getting started with yeast. *Methods Enzymol.* **194**:3-20.

Silveira, W.B.; Passos, F.J.V.; Mantovani, H.C.; Passos, F.M.L. (2005). Ethanol production from cheese whey permeate by *Kluyveromyces marxinaus* UFV-3: a flux analysis of oxido-reductive metabolism as a function of a lactose concentration and oxygen levels. *Enzyme Microb. Technol.* **36**, 930-936

Suleau, A.; Jacques, N.; Reitz-Ausseur, J. and Casaregola, S. (2006). Intraspecific gene expression variability in the yeast *Kluyveromyces lactis* revealed by micro-array analysis. *FEMS Yeast Res.*, **5**(6-7):595-604.

Suleau, A.; Gourdon, P.; Reitz-Ausseur, J. and Casaregola, S. (2006). Transcriptomic analysis of extensive changes in metabolic regulation in *Kluyveromyces lactis* strains. *Eukaryot. Cell*, **5**(8):1360-70.

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

Wasilenko, J. and Fridovich-Keil, J.L. (2006). Relationship between UDP-galactose 4'-epimerase activity and galactose sensitivity in yeast. *J. Biol. Chem.*, **281** (13): 8443-8449.

Vincent, O.; Carlson, M. (1999). Gal83 mediates the interaction of the Snf1 kinase complex with the transcription activator Sip4. *EMBO J*, v. 18, p. 6672–6681, 1999.

Wiedemuth, C.; Breunig, K.D. (2005). Role of Snf1p in regulation of intracellular sorting of the lactose and galactose transporter Lac12p in *Kluyveromyces lactis*. *Eukaryot. Cell*, **4**(4): 716-721.

Ye, L.; Kruckeberg, A. L.; Berden, J. A.; van Dam, K. (1999). Growth and glucose repression are controlled by glucose transport in *Saccharomyces cerevisiae* cells containing only one glucose transporter. *J. Bacteriol.* **181**: 4673–4675.

Young, E. T., Dombek K. M., Tachibana C., Ideker, T. (2003). Multiple pathways are co-regulated by the protein kinase Snf1 and the transcription factors Adr1 and Cat8. *Journal Biological Chemistry*, v. 278, p. 26146–26158.

Zenke, F.T.; Zachariae, W.; Lunkes, A. and Breunig, K.D. (1993). Gal80 proteins of *Kluyveromyces lactis* and *Saccharomyces cerevisiae* are highly conserved but contribute differently to glucose repression of the galactose regulon. *Mol. Cell Biol.*, **13**(12): 7566-76.

Zenke, F.T.; Engels, R.; Vollenbroich, V.; Meyer, J.; Hollenberg, C.P. and Breunig, K.D. (1996). Activation of Gal4p by galactose-dependent interaction of galactokinase and Gal80p. *Science*, **272**:1662-5.

CAPÍTULO 3

Isolation of mutants able to suppress the lactose toxicity in *K. lactis* *lac4Δ*

Silveira, WB^{1,2} Passos, FML² and Breunig KD¹

¹ Institut für Genetik, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Halle, Germany

² Departamento de Microbiologia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Brazil

ABSTRACT

As an Attempt to identify negative regulators of lactose uptake in the yeast *Kluyveromyces lactis*, a genetic screen was performed (multicopy suppression). The multicopy suppression was used to select transformants able to suppress the lactose toxicity in *Klac4* mutant grown on minimal medium containing lactose and glycerol as carbon source. The transformants were selected on SC medium containing lactose 0.5% plus galactose 0.5% and glycerol 2% (w/v). Among the 68 plasmids rescued from WBS1 (*lac4* mutant) transformed with a Kep6-based genomic plasmid library, nine larger than Kep6 (empty vector) could be rescued. Eight of those plasmids had an identical restriction pattern. The plasmid designated as 308 was chosen as a representative of this class. The other plasmid, designated 312, showed a different pattern. Both plasmids were subjected to sequence analysis from the ends of the insert. The plasmid 308 has an insert with high homology to

the sequence KLLAOD17710g (Genolevures database). The p312 has 4 ORFs, KlactI0767, KlactI0766, KlactI0765 and KlactI0758. The plasmids 308 and 312 were transformed back into WBS1 strain and plated on glucose and selective medium. A spot assay was carried out to evaluate the growth of the retransformants 312 and 308 on selective medium. Unexpectedly, only the retransformants 312-7 and 308-1 were able to suppress at least partially the lactose toxicity. This result suggested that growth on selective medium may not be due to the plasmid. In fact, *Kl/ac4* mutants (312-7 and 308-1) cured of those plasmids were still able to partially suppress the lactose toxicity. Further analyses indicate that the suppression of lactose toxicity by those mutants was not due to impaired lactose uptake.

1. INTRODUCTION

The yeast *Kluyveromyces lactis* (*K. lactis*) has called attention for exhibiting a physiology distinct from *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*). For this reason, *K. lactis* became an alternative model to study yeast response to the environment (Schaffrath and Breunig 2000, Breunig et al 2000). *K. lactis* is found in dairy products and thus is able to use lactose as a carbon source. It has been found in different dairy products such as kefir, koumiss, and cheese together with lactic acid bacteria and other lactose-fermenting yeasts (Kumura et al 2004, Suleau et al 2006). Because in those products there is a tight competition between yeast and bacteria to assimilate the available nutrients, *K. lactis* should have developed a fine mechanism to adapt to different nutrient concentrations such as lactose present in the dairy environment. Sugar transport has an important role in the regulation of carbon metabolism in yeast (Suleau et al 2006), for this reason it is expected that *K. lactis* has mechanisms able to regulate the lactose transport both positively and negatively. In the last years, much information was accumulated about the regulation of lactose metabolism in *K. lactis* at the transcriptional level. However few studies exist on other levels of regulation (Gödecke et al 1991, Zenke et al 1996). Interestingly, Wiedemuth and Breunig (2005) showed that the serine treonine kinase KISnf1p regulates the expression of the *LAC12* gene, which encodes the lactose permease, at transcriptional level as well as at post-translational level. In *Kisnf1* mutant,

the Lac12p is localized mainly at an intracellular compartment, thus Snf1p activity seems to be required to direct or stabilize the protein in the plasma membrane. The mechanism that KISnf1p uses to regulate the Lac12GFPp still needs to be understood. Recently it has been reported that lactose is toxic to *Kl/ac4* mutant growing in the presence of lactose and other carbon sources with exception of glucose (Lodi and Doninni 2005). However in the double mutant *Kl/ac4* and *Kl/ac12* the lactose toxicity was abolished. For this reason the lactose toxicity could prove to be a good strategy to identify negative regulators of lactose transport in *K. lactis*, as well as other regulators involved in the suppression of the lactose toxicity. The present work is an attempt to isolate mutants able to negatively regulate lactose transport and consequently to get more insight about strategies used by *K. lactis* to regulate lactose transport.

2. MATERIAL AND METHODS

2.1. Strains and growth media

The JA6LAC12GFP strain was grown on YNB medium containing fluorootic acid (FOA) to isolate strains resistant to FOA. The JA6LAC12GFP strain resistant to FOA is referred to as JF12R. The *lac4* mutant strain was derived from strain JF12R by replacement of the wild type *LAC4* gene by *lac4::ScURA3*. The *lac4::ScURA3* fragment was released from the plasmid pD4 using the enzyme XbaI. The *lac4* gene deletion was confirmed by PCR. The *lac4* mutant strains resistance to FOA is referred as WBS1. The strains WBS308 and WBS312 were obtained from multicopy suppression experiments (see results for more information). Cells were grown on synthetic complete medium (SC) (0.67% yeast nitrogen base with amino acids and nucleobases) (Sherman 1990) with indicated carbon sources. The same medium lacking uracil was used when plasmid selection was necessary.

Strain	genotype	Reference
JA6-LAC12GFP	<i>MATα ade1-600 adeT600 ura3-12 trp1-11 LAC9-2 LAC12-EGFP-ScURA3</i>	Wiedemuth and Breunig 2005
JF12R	<i>Scura3</i> derivative of JA6-LAC12GFP	This study
JF12RD4	<i>MATα ade1-600 adeT600 ura3-12 trp1-11 LAC9-2 LAC12-EGFP- Scura3 lac4::ScURA3</i>	
WBS1	<i>Scura3</i> derivative of JF12RD4	This study
WBS308	<i>MATα ade1-600 adeT600 ura3-12 trp1-11 LAC9-2 LAC12-EGFP- Scura3 lac4::Scura3</i> (chromossomal mutation)	This study
WBS312	<i>MATα ade1-600 adeT600 ura3-12 trp1-11 LAC9-2 LAC12-EGFP- Scura3 lac4::Scura3</i> (chromossomal mutation)	This study

2.2. Plasmids and Sequencing

Multicopy suppression was performed using a Kep6-based genomic plasmid library. The plasmids were rescued from yeast transformants and transformed in *E. coli* DH5 α . The plasmids isolated from *E. coli* Dh5 α had their restriction patterns analyzed. Plasmids were transformed back into WBS1 strain to analyze the phenotype. The sequencing was performed by Sanger method (Dideoxynucleotide chain termination) (Sanger et al 1977), using the Hot Star Taq® Master Mix Kit (Qiagen). It was used in the reaction (final volume 20 μ l), 600 ng of plasmidial DNA, 1.6 μ l of primer V10 (ATCGGTGATGTCGGCG) or V11 (TCCGACCGCTTTGGC), 2 μ l of Hot Star Taq Plus Master Mix and 2 μ l of buffer 10x. The samples were incubated in PCR equipment machine (Eppendorf) using the following program: 95°C for 2 minutes followed by 30 cycles of 95°C for 30 seconds, 50°C for 15 seconds, 60°C for 4 minutes. To precipitate the reaction products 80 μ l of DNASE free water, 10 μ l of ammonium acetate 3M and 250 μ l of ethanol 96% (v/v) were added. After centrifugation the DNA pellet was resuspended in Hi-di formamide and then sequenced using the sequencer (Applied Biosystems / HITACHI - 3130x/ Genetic Analyzer). The sequences obtained were compared to sequences in Genolevures database (<http://cbi.labri.fr/Genolevures>) using the BLAST program (Basic Local Alignment Search Tool).

2.3. Fluorescence microscopy analysis

The Lac12GFPp localization was analysed by fluorescence microscopy (Zeiss Axioplan2e microscope equipped with a 6100 alpha-Plan Fluor objective and differential-interference-contrast). The FM4-64 dye (Molecular Probes, Eugene, OR) localization was analysed using a Zeiss Axioplan2e microscope equipped with a 6100 alpha-Plan Fluor objective and differential-interference-contrast).

3. RESULTS

3.1. Multicopy suppression

The aim of the present work was to identify genes whose products negatively regulate lactose uptake in *K. lactis*. The *K. lactis lac4* mutant, defective in β -galactosidase activity, can not assimilate lactose as a carbon source, but grows normally on many other carbon sources, such as glycerol. However, when lactose is present together with other carbon sources in the medium the *lac4* mutant is not able to grow (Lodi & Doninni 2005). Some evidences indicate that the lactose toxicity is mainly due to intracellular osmotic pressure leading to cell death. The deletion of the gene *LAC12* (lactose permease gene) abolishes the inhibitory effect of lactose and allows the cell to assimilate other carbon sources. Therefore, the lactose toxicity can be used to select multicopy suppressors with impaired lactose uptake. To avoid selection of *lac12* mutant in the multicopy suppression experiments it was used the strain WBS1, which contains two lactose carriers.

The strain WBS1 was transformed with a *Kep6*-based genomic plasmid library and the transformant colonies were selected on YNB medium without uracil containing lactose 0.5% plus glycerol 2% (w/v). As a control the strain WBS1 was transformed with *Kep6* empty vector plasmid. Surprisingly the number of selected colonies using *Kep6* vector was similar to the number of colonies selected using the genetic library. This result indicated that selection

for lactose toxicity did not work. Perhaps, the expression of *LAC12* gene was not enough to promote the accumulation of lactose intracellularly because the concentration of the inducer (galactose) in *lac4* mutant was too low. For this reason 0.5% galactose was added to the selection medium. Initially, we streaked some transformants obtained with *kep6* on YNB medium containing lactose 0.5% (w/v) plus galactose 0.5% (w/v) plus glycerol 2% (w/v) to confirm lactose toxicity. In fact, those transformants did not grow on the selection medium after 96 hours indicating that this medium could be used in the selection. In addition no colonies were present when the strain WBS1 was transformed with library genetic and *Kep6* (empty vector), indicating that the medium works better to select suppressors of lactose toxicity. Since in the first transformation no transformants were obtained, different competent cells have been transformed as an attempt to get multicopy suppressors.

In parallel, twenty nine WBS1 (*lac4* mutant) competent cells were transformed with the genetic library. A total of 1113 transformants was obtained. As a control, WBS1 strain transformed with the *Kep6* empty vector resulted in a low number of transformants.

Among the 68 plasmids rescued from WBS1 (*lac4* mutant) transformed with the *Kep6*-based genomic plasmid library, nine plasmids larger than *Kep6* (empty vector) could be rescued. Eight of the nine plasmids had an identical restriction pattern (data not showed). Plasmid 308 was chosen as a representative of this class. Plasmid 312 was the one actually showing a different pattern. Both plasmids were then subjected to sequence analysis from the ends of the insert.

The plasmid 308 has an insert with high homology with the sequence KLLAOD17710g (Genolevures database). The sequence had 98% similarity with 26S rRNA gene. The p312 has 4 ORFs, *KlactI0767*, *KlactI0766*, *KlactI0765* and *KlactI0758*. The product of the ORF *Klact0767* has 50% of identity to *ScMeh1p* (YKR007wp). The product of the ORF *KlactI0766* has 39% identity with the *ScMrpI13p*. The product of the ORF *KlactI0766* has some similarity with a protein Ca5008 of unknown function and the product of the ORF *KlactI0758* is a hypothetical protein which does not have similarity with any known protein.

3.2. The suppression of lactose toxicity is due to a spontaneous mutation

The plasmids 308 and 312 were transformed back into WBS1 strain and plated on glucose and selective medium. A spot assay on selective medium was carried out to evaluate the growth of the retransformants 312 and 308. Unexpectedly only the retransformants 312-7 and 308-1 were able to partially suppress lactose toxicity and only (Figure 1). This result suggests that growth on selective medium may not due to the plasmid.

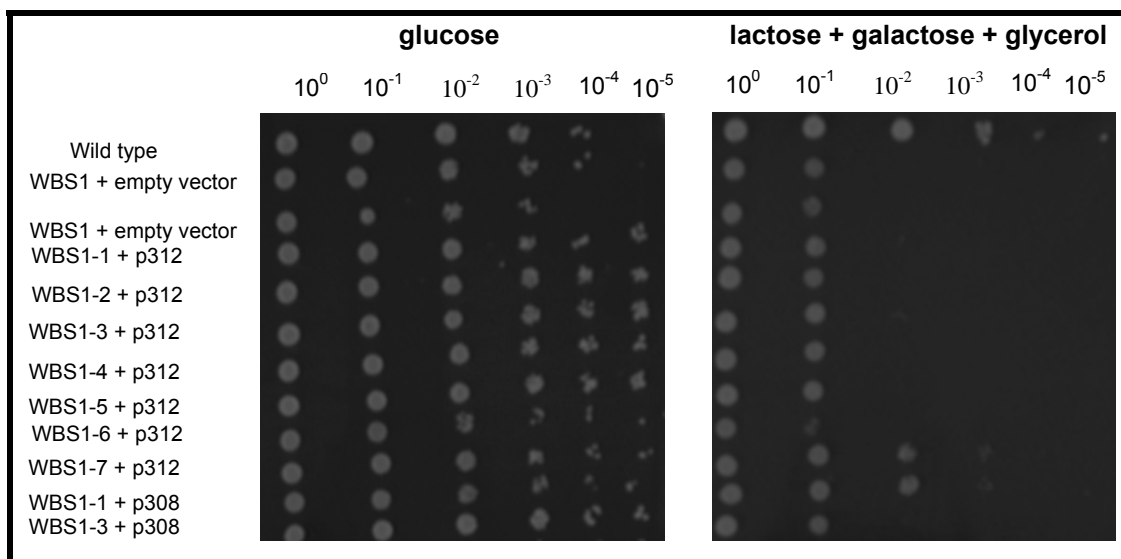


Figure 1 – Growth spot assay. Serial dilutions of wild type strain and *lac4* mutants (WBS1 strain) transformed with empty vector (Kep6), p312 and p308 were spotted on SC plates without uracil containing glucose 2% (w/v) (left) or SC plates containing lactose 0.5% (w/v), galactose 0.5% (w/v) and glycerol 2% (w/v) (right).

In order to test if the retransformants WBS1-7 and WBS1-8 growth was due to multicopy suppression or to a spontaneous mutation, two of each class of retransformants showing difference in growth were cured of the plasmids. The retransformants cured of plasmids are referred as WBS 308 and WBS312. Figure 2A shows the growth on selective medium. Figure 2B shows the growth on glucose (control).

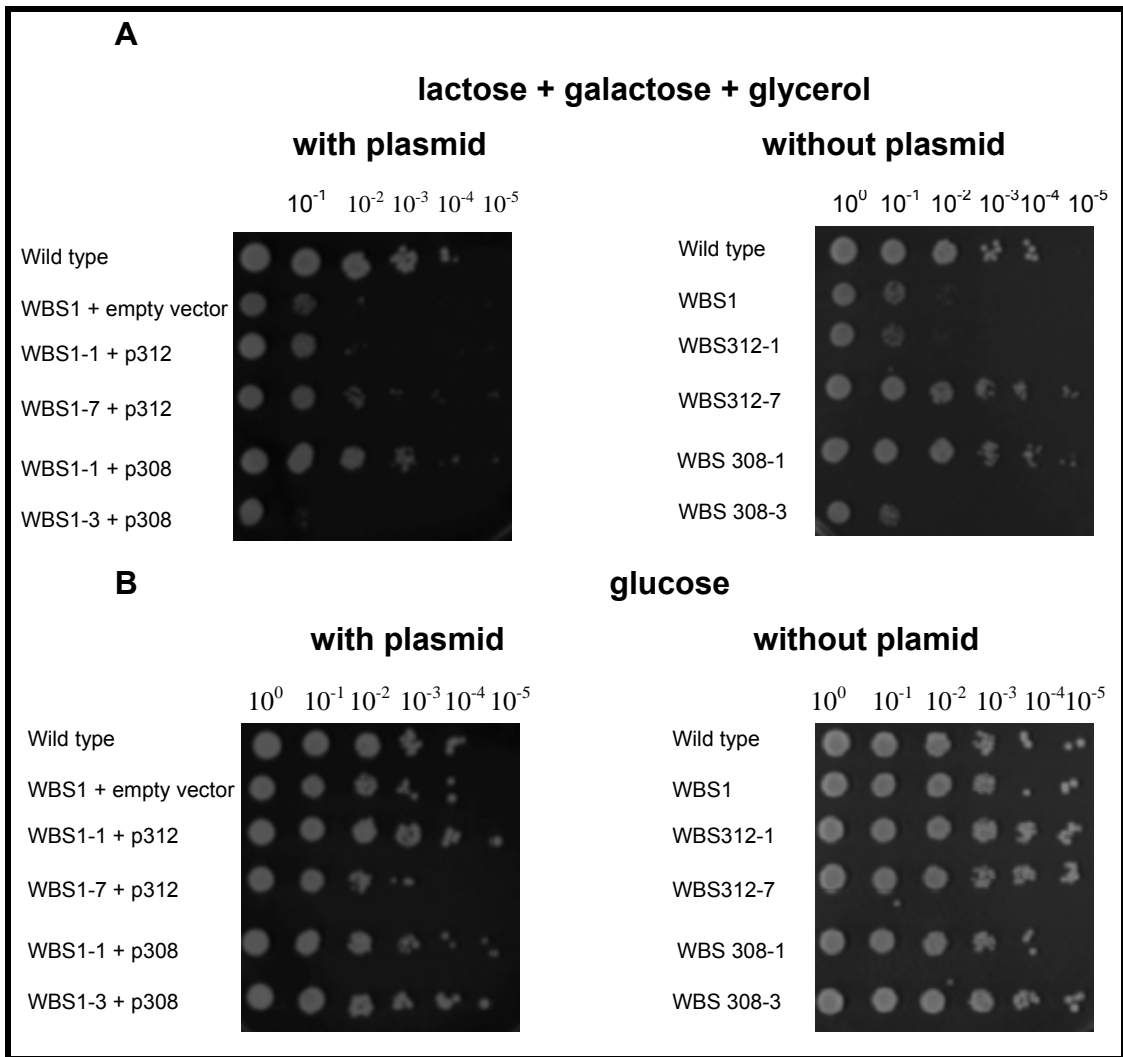


Figure 2 – Influence of the loss of plasmid on suppression of lactose toxicity. Serial dilutions of wild type strain and *lac4* mutants (WBS1 strain) transformed with empty vector (Kep6), p312 and p308 were spotted on SC plates without uracil containing glucose 2% (w/v) or SC plates without uracil containing lactose 0.5% (w/v), galactose 0.5% (w/v) and glycerol 2% (w/v) (selective medium). The strains cured of those plasmids were spotted in the same media, however containing uracil.

As it can be observed in the Figure 2, the strains WBS 312-7 and WBS 308-1 cured of the plasmids 312 and 308 were still able to suppress lactose toxicity. These results indicate that the suppression of lactose toxicity was probably due to a spontaneous mutation. In order to facilitate the designation, the strains WBS 312-7 and WBS308-1 are then referred as WBS 312 and WBS308, respectively.

3.3. Growth on lactose is not impaired in the WBS308 and WBS312 strains

It was expected that if the suppression of lactose toxicity in the mutants was caused by reduced Lac12p function, they would grow poorly on lactose when the *lac4* gene was restored on those strains. Then in order to analyse the growth of the strains WBS308 and WBS312 on lactose medium, which were able to suppress at least partially the lactose toxicity, the *LAC4* gene was introduced into the WBS308, WBS 312 and WBS1 (sensitive to lactose toxicity) strains. X-gal was added on YNB medium with lactose, because X-Gal is actively taken up by the Lac12p permease and cleaved intracellularly by *K. lactis* β -galactosidase giving blue staining to the colonies. This assay should allow for a sensitive quantitation of Lac12p. Figure 3 shows the growth of the mentioned strains on lactose.

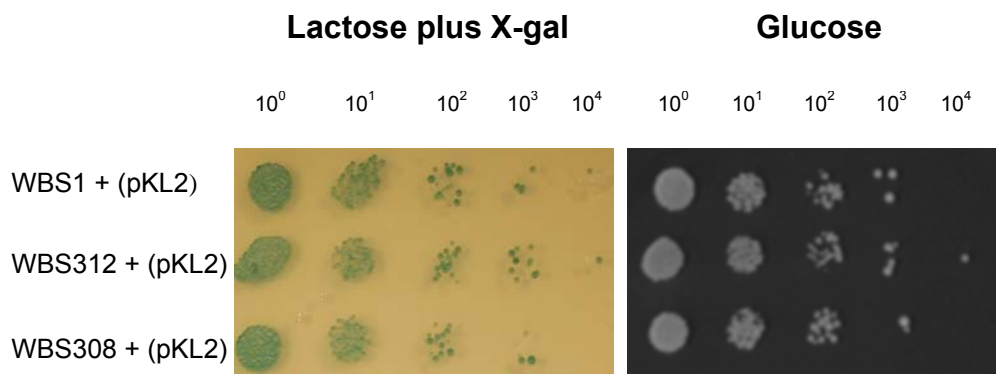


Figure 3 – The growth of the strains WBS 308 and WBS312 is not impaired on lactose. Growth spot assay. Serial dilutions of WBS1, WBS308 and WBS 312 transformed with pKL2 plasmid, which carries the *LAC4* gene, were spotted on SC plates without tryptophan containing lactose 2% (w/v).

As observed in Figure 4 the strains WBS308 and WBS312 grew equally to WBS1 (sensitive to lactose toxicity). Furthermore the blue stained colonies in WBS1 (sensitive to lactose toxicity) were identical to colonies in the strains WBS312 and WBS308 indicating that the transport of lactose was not impaired.

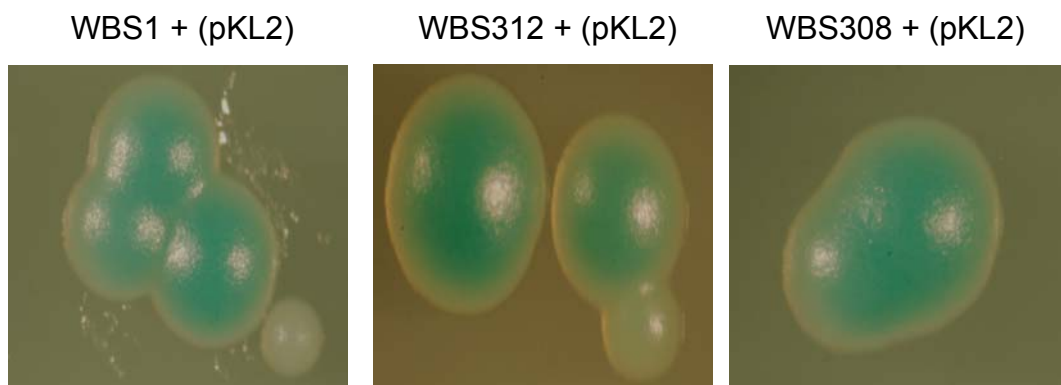


Figure 4 – Comparison of blue stained colonies between WBS1 (lactose sensitive) and strains WBS312 and WBS308.

3.4. The Lac12GFPp intracellular distribution is not changed by spontaneous mutation in WBS308 and WBS312 strains

As can be observed in the figure 5 below, the LAC12GFPp cellular distribution of the mutant strains was similar to the control (Wild type and WBS1 mutant), in other words the permease was localized in plasma membrane as well as in an intracellular compartment. However the size of the WBS308 colony is larger than both WBS312 and WBS1. This phenotype may indicate that the strain WBS308 suppress the lactose toxicity by a different mechanism than WBS12 strain.

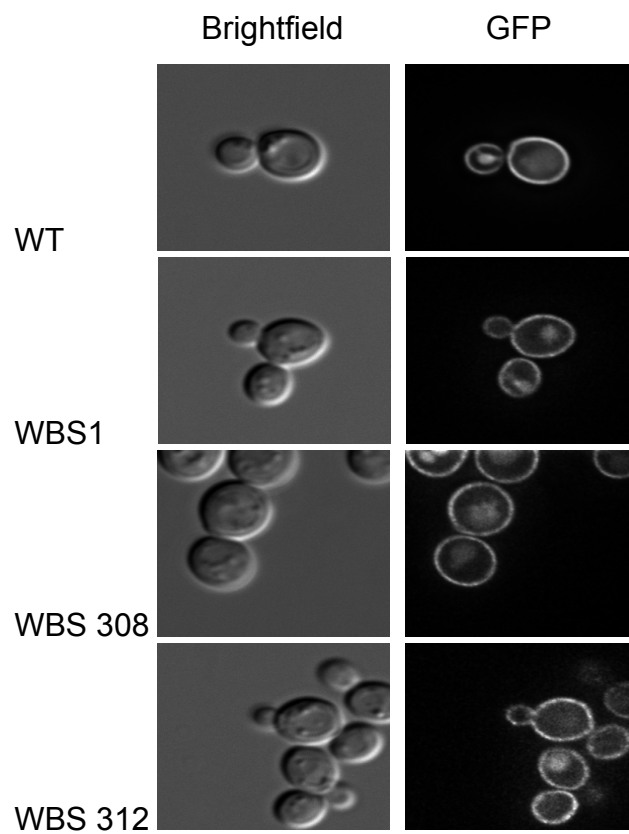


Figure 5 – Lac12GFPp localization is similar in WBS1, WBS308 and WBS312 strains. The strains were grown SC medium containing lactose 0.5% (w/v), galactose 0.5% (w/v) and glycerol 2% (w/v) (selective medium).

4. DISCUSSION

In this work, we have used multicopy suppression as a strategy to identify genes, whose products could be involved in the suppression of lactose toxicity in *K. lactis lac4* mutant. It has been observed that the lactose toxicity seems to be due to osmotic pressure resulting from lactose accumulation (Lodi and Donnini 2005). Thus, we would expect to isolate genes whose products could be involved in negative regulation of lactose uptake or osmotic pressure regulation.

In this work two transformants seemed to be promising candidates to suppress lactose toxicity. One transformant carries the plasmid 312 and another carries the plasmid 308. However, the retransformants 308 failed to suppress the lactose toxicity again on selective medium. Only one retransformant was able to suppress the lactose toxicity on spot assay test. When this retransformant has been cured of the plasmid, the resultant strain WBS308 was able to suppress at least partially the lactose toxicity, suggesting that the suppression was due to a spontaneous mutation. The second candidate (retransformant 312) carries a plasmid containing 4 ORFs. The product of one of these ORFs presents 50% of identity to ScMeh1p. The ScMeh1p is a component of the EGO complex, which is involved in the regulation of microautophagy (Dubouloz et al 2005), and of the GSE complex, which is required for proper sorting of Gap1p amino acid permease (Gao and Kaiser 2006). We could speculate that this ORF would be involved

in lactose transport regulation. Nevertheless, the retransformant 312 also failed to suppress the lactose toxicity because only one retransformant suppress partially the lactose toxicity. When this retransformant was cured of the plasmid, the resultant strain WBS308 was able to suppress the lactose toxicity indicating that the suppression is not due to a gene present on the plasmid, but probably due to a spontaneous mutation. From these results we conclude that multicopy suppression is not a useful strategy to identify regulators that suppress the lactose toxicity.

We have addressed the question whether the 2 mutant strains (WBS 308 and WBS 312) suppressed the lactose toxicity due to impaired of lactose uptake. Two findings showed that the transport of lactose is not impaired in WBS308 and WBS312 strains: (1) the LAC12GFP permease localization was similar to WBS1 (sensitive to lactose) and JA6LAC12GFP (wild type) and (2) the blue staining colonies in WBS1 (sensitive to lactose toxicity) were identical to colonies in the strains WBS312 and WBS308. Because lactose transport is not impaired, it is possible that the strains WBS312 and WBS308 have suppressed the lactose toxicity regulating the osmotic pressure.

In this work we have not succeed in isolating negative regulators of the lactose uptake. The first question that arises is whether a negative regulator of lactose uptake actually exists. The second question is whether the strategy used for screenibg based on lactose toxicity was adequate to isolate negative regulators of lactose uptake. Based on our results we conclude that the toxicity of lactose is not an useful strategy to identify negative regulators of lactose uptake, however we can not exclude the possibility that these regulators exist. Perhaps other strategies may prove more useful than the lactose toxicity to identify negative regulators of lactose uptake.

5. REFERENCE

Breunig, K.D.; Bolotin-Fukuhara, M.; Bianchi, M.M.; Bourgarel, D.; Falcone, I. F.; Frontali, L.; Goffrini, P.; Krijger, J.J.; Mazzoni, C.; Milkowski, C.; Steensma, H. Y.; Wésolowski-Louvel, M. and Zeeman, A. M. (2000). Regulation of primary carbon metabolism in *Kluyveromyces lactis*. *Enzyme Microb. Technol.*, 26, 771-780.

Dubouloz, F.; Deloche, O.; Wanke, V.; Cameroni, E.; De Virgilio, C. (2005). *The TOR and EGO Protein Complexes Orchestrate Microautophagy in Yeast Molecular Cell*, 19: 15-26.

Gao, M.; Chris, A.; Kaiser, A. C. (2006). A conserved GTPase-containing complex is required for intracellular sorting of the general amino-acid permease in yeast. *Nat. Cell Biol.*, 8(7): 657-667.

Gödecke, A.; Zachariae, W.; Arvanitidis, A.; Breunig, K.D. (1991). Coregulation of the *Kluyveromyces lactis* lactose permease and β -galactosidase genes is achieved by interaction of multiple LAC9 binding sites in a 2.6 kbp divergent promoter. *Nucl. Acids Res.*, 19: 5351-5358.

Grohmann, L.; Kitakawa, M.; Isono, K.; Goldschmidt-Reisin, S.; Graack, H.R. (1994). The yeast nuclear gene MRPL13 codes for a protein of the large subunit of the mitochondrial ribosome. *Curr. Genet.*, 26(1):8-14.

Lodi, T.; Claudia, Donnini, C. (2005). Lactose-induced cell death of β -galactosidase mutants in *Kluyveromyces lactis*. *FEMS Yeast Research*, 5: 727-734.

Kumura, H.; Tanoue, Y.; Tsukahara, M.; Tanaka, T. and Shimazaki, K. (2004). Screening of Dairy Yeast Strains for Probiotic Applications. *J. Dairy Sci.*, 87: 4050-4056.

Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sc.*, 74(12):5463-5467

Schaffrath, R.; Breunig, K.D. (2000). Genetics and molecular physiology of the yeast *Kluyveromyces lactis*. *Fungal Genet Biol.*, **30**(3):173-90.

Sherman, F. (1990). Guide to yeast genetics and molecular biology. Getting started with yeast. *Methods Enzymol.* **194**:3–20.

Suleau, A.; Gourdon, P.; Reitz-Ausseur, J.; Casaregola, S. (2006) Transcriptomic Analysis of Extensive Changes in Metabolic Regulation in *Kluyveromyces lactis* Strains. *Eukaryot. Cell*, 5(8): 1360-1370.

Wiedemuth, C. Breunig, K.D. (2005). Role of Snf1p in regulation of intracellular sorting of the lactose and galactose transporter Lac12p in *Kluyveromyces lactis*. *Eukaryot. Cell*, 4(4): 716-721.

Zenke, F.T.; Engels, R.; Vollenbroich, V.; Meyer, J.; Hollenberg, C.P. and Breunig, K.D. (1996). Activation of Gal4p by galactose-dependent interaction of galactokinase and Gal80p. *Science*, 272:1662-1665.

CONCLUSÕES

Embora a levedura *Kluyveromyces lactis* seja encontrada no leite e derivados, cujo principal açúcar é a lactose, estudos sobre o transporte de lactose são raros se comparados com o número de estudos sobre o transporte de glicose nessa mesma levedura. Em *K. lactis*, a permease de lactose (Lac12p) promove tanto o transporte de lactose quanto o de galactose. Recentemente foi relatado o primeiro estudo de localização subcelular da permease de lactose em *K. lactis*. Foi demonstrado que no mutante *Klsnf1* a permease de lactose é localizada predominantemente em compartimentos intracelulares quando comparada com a linhagem selvagem. Porém, o papel da *Klsnf1p* na regulação pós-traducional da permease de lactose não é conhecido.

Os dados deste trabalho indicaram que *K. lactis* tem maior afinidade para lactose do que para glicose. Foi também observado que o mutante *Klsnf1* apresenta menor afinidade para lactose e glicose, em comparação com a linhagem selvagem.

Em *S. cerevisiae*, a atividade da cinase *Scsnf1p* é fortemente regulada pela disponibilidade de glicose. Em *K. lactis* não está claro se a glicose regula a atividade da *Klsnf1p*. Nossos resultados apontaram que a localização subcelular da permease de lactose não foi alterada em culturas de *K. lactis* em fase exponencial de crescimento foi crescida exponencialmente na presença de lactose e glicose. Esse resultado

evidencia que pelo menos a atividade da Klsnf1p envolvida na regulação pós-traducional da permease lactose não é afetada por glicose.

De forma interessante, observou-se que em culturas de *K. lactis* em fase estacionária de crescimento a localização subcelular da permease Lac12p em lactose é diferente daquelas em galactose e glicose, as quais foram similares entre si. Em lactose, a permease é localizada em lóbulos que parecem estar próximos ao vacúolo. Em recente trabalho foi mostrado que no mutante *Klsnf1* a permease é localizada predominantemente em compartimentos intracelulares, cujos autores, entretanto, não identificaram qual seria o compartimento. Aqui, mostrou-se que no mutante *Klsnf1* a permease é localizada intracelularmente na membrana do vacúolo, sinalizando que a cinase regula a translocação da permease para o lúmen do vacúolo. Neste trabalho foi também investigada a possibilidade de a Klsnf1p estar envolvida com a regulação da estabilidade do transcrito *LAC12*. Os dados aqui revelaram que não houve diferença no nível do transcrito, indicando que a influência da Klsnf1p na regulação da expressão da permease da lactose é fortemente exercida somente em nível pós-traducional.

Nos últimos anos, alguns resultados têm apontado para o papel da concentração de oxigênio na regulação do transporte de açúcares em leveduras. Os dados deste trabalho evidenciaram que baixos níveis de oxigênio aumentam o sinal de permease de lactose na membrana, em comparação com níveis normais de oxigênio, indicando que concentração de oxigênio pode regular a localização subcelular dessa permease. Além disso, demonstrou-se que em hipóxia a velocidade de consumo da lactose e da produção de etanol foi maior do que em normoxia, indicando uma ligação entre atividade de transporte e fluxo fermentativo em *K. lactis*.

Na tentativa de identificar proteínas que regulam negativamente o transporte da lactose em *K. lactis*, realizou-se uma triagem genética (supressão multicópia). Considerando que lactose é tóxica para o mutante *Kllac4* cultivado em meio mínimo contendo lactose e glicerol como fontes de carbono e que um dos mecanismos para suprimir esse efeito tóxico é a baixa atividade de transporte da lactose, a estratégia foi selecionar transformantes capazes de suprimir a toxicidade de lactose.

Os dados deste trabalho demonstraram que a supressão deveu-se a uma mutação espontânea e não a presença dos plasmídeo multicópia, bem como que nesse mutante espontâneo o transporte da lactose não foi prejudicado.