

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA

**TRANSPORTE DE LA AMINOPEPTIDASA I A LA
VACUOLA DE *Saccharomyces cerevisiae*:
IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE
NUEVOS COMPONENTES DEL PROCESO**

R.F.M. 22283

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID REGISTRO GENERAL
Entrada 01 N.º 20020000365E 22/04/02 12:10:24

EDUARDO SILLES MCLANEY

Madrid, 2002

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA

**Transporte de la Aminopeptidasa I a la Vacuola de *Saccharomyces cerevisiae*:
Identificación y Caracterización de Nuevos Componentes del Proceso**

Memoria que para optar al grado de Doctor
presenta el Licenciado en Ciencias Biológicas
Eduardo Silles McLaney

Directora
Dra. María Jesús Mazón Calpena
Investigadora Científica del
Consejo Superior de Investigaciones Científicas
Instituto de Investigaciones Biomédicas "Alberto Sols", C.S.I.C.-U.A.M.

Tutora
Dra. Pilar Eraso Mazmela
Profesora Titular
Departamento de Bioquímica
Facultad de Medicina de la U.A.M.

Madrid, 2002

Agradecimientos

Quiero expresar mi agradecimiento a las personas que han hecho posible o han facilitado enormemente la realización de esta Tesis:

Quiero agradecer de forma muy especial a la directora de esta Tesis, la doctora María Jesús Mazón, todo el interés y el trabajo invertido en este proyecto y fuera de él. La estancia en su laboratorio ha sido una experiencia agradable y muy enriquecedora. Agradezco al doctor Ignacio Sandoval su ayuda, que ha sido importante durante el desarrollo de la Tesis. Agradezco a los doctores Francisco Portillo y Pilar Eraso (gracias por ser mi tutora) la buena disposición mostrada para discutir y aportar ideas en el trabajo que se presenta aquí. También me han prestado toda su ayuda los doctores Carlos Gancedo, Juana María Sempere y Rosario Lagunas.

Muchos de los experimentos que se muestran en esta memoria no hubieran podido llevarse a cabo sin los materiales (plásmidos, anticuerpos, cepas,...) cedidos generosamente por los doctores Ignacio V. Sandoval, Rosario Cueva, Roger Schneider y Dieter H. Wolf. También quisiera agradecer la financiación que he recibido por parte de la Comunidad Europea (con el programa BMH4-CT96-0010).

Gracias a Lali, por su simpatía y su paciencia conmigo. Muchas veces me ha ayudado con los experimentos cuando a mí me faltaban las manos. Mis amigos Vicky y JuanMa han sido una referencia para mí, guiándome a cada momento cuando llegué al laboratorio. Gracias a Regina, Bárbara, Mari Cruz y Mónica, que han hecho la estancia en el laboratorio algo muy especial. También a Rocío, Minia, Diana, Laura, Paco, Noemí, Susana y David por ser unos compañeros de laboratorio, aunque esporádicos, fantásticos. Gracias a Oscar por su generosidad y haber estado siempre dispuesto a echarme una mano (por ejemplo en el ordenador) durante el tiempo que hiciera falta. Su apoyo ha sido muy importante en muchos momentos durante la Tesis. A mis compañeros de otros laboratorios vecinos Liset, Mónica, Cristina, María José, Clara, Javier, Tanilo, Pilar, Nieves, Belén, Nacho, Rocío Pedro, Ana, Marta que también me han ayudado, amablemente, en todo momento y/o han compartido el tiempo para comer.

Muchas gracias al personal de servicios generales del IIB: radioprotección, fotografía, bioinformática, lavado, dibujo, secuenciación,... Su labor ha servido también de gran ayuda.

A mis amigos Jose, Elena, Cristina, Sonia, Sole y Mar por dejar que me olvidara del laboratorio. A mis padres, a mis hermanos, a Maite, a Nuria y a mis sobrinos. A Kati, Manolo, Mano, Carmen y Esi.

Y, especialmente, a Ana, por todo, por ser así. Por su importancia para mí quiero dedicarle esta Tesis.

Índice

ABREVIATURAS	1
RESUMEN	2
SUMMARY	3
INTRODUCCIÓN	4
1. Principios básicos del transporte y distribución intracelular de proteínas	4
2. Transporte y distribución intracelular de proteínas en la ruta secretora	5
2.1 Etapas en la ruta secretora	6
2.1.1 Entrada de las proteínas desde el citoplasma al retículo endoplásmico	6
2.1.2 Formación de las vesículas de transporte	8
2.1.3 Selección de la carga proteica de las vesículas de transporte	9
2.1.4 Fusión de las vesículas de transporte a la membrana y especificidad de esta	10
3. Rutas de transporte a la vacuola de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	11
3.1 Rutas de transporte de proteínas residentes de vacuola	12
3.1.1 Ruta de la fosfatasa alcalina	12
3.1.2 Ruta cvt	13
3.2 Rutas de transporte de proteínas que son degradadas en la vacuola	13
3.2.1 Macroautofagia	13
3.2.2 Pexofagia	13
3.2.3 Ruta degradativa de la FBPasa	13
4. Transporte de la Aminopeptidasa I a la vacuola	14
4.1 La Aminopeptidasa I utiliza una ruta alternativa para viajar a la vacuola	14
4.2 La Aminopeptidasa I viaja a la vacuola dentro de vesículas de doble membrana	16
4.3 Análisis molecular del transporte de API en vesículas	19
OBJETIVOS	27
MATERIALES Y MÉTODOS	28
1. Microorganismos utilizados en este trabajo	28
1.1 Cepas de <i>Escherichia coli</i>	28
1.2 Cepas de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	28
2. Medios de cultivo, condiciones de crecimiento y mantenimiento de las cepas	30
2.1 <i>Escherichia coli</i>	30
2.2 <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	30
2.3 Mantenimiento de las cepas	31
3. Manipulación de ácidos nucleicos	31
3.1 Vectores	31
3.2 Construcción de plásmidos	35
3.2.1 Construcciones en pUC18	35
3.2.2 Construcciones en pCR®2.1-TOPO®	35
3.2.3 Construcciones en pRS306	36
3.2.4 Construcciones en pRS425	36
3.2.5 Construcciones en pYES 2.0	36
3.2.6 Construcciones en pGFP-N-FUS	36
3.2.7 Construcciones en pGFP-C-FUS	37
3.2.8 Construcciones en pGBT9	37
3.2.9 Construcciones en pACT2	38
3.3 Preparación de ácidos nucleicos	39
3.3.1 Obtención de DNA plasmídico de <i>E.coli</i>	39
3.3.2 Extracción de plásmido de levadura	39
3.3.3 Extracción de DNA genómico de levadura	39
3.4 Técnicas de modificación de DNA	39
3.4.1 Digestión del DNA	39
3.4.2 Desfosforilación del DNA	40

3.4.3 Ligamiento de fragmentos de DNA	40
3.4.4 Generación de extremos romos	40
3.5 Métodos de transformación celular	40
3.5.1 Transformación de <i>E.coli</i>	40
3.5.2 Transformación de levadura	40
3.6 Interrupciones génicas	41
3.6.1 Amplificación de módulo de interrupción desde DNA genómico	41
3.6.2 Aislamiento del módulo de interrupción	41
3.6.3 Estrategia de los oligonucleótidos híbridos	42
3.7 Reemplazamiento de alelo	42
3.8 Electroforesis de DNA en geles de agarosa	44
3.9 Amplificación de fragmentos de DNA por reacción en cadena de la polimerasa	44
4. Técnicas bioquímicas	45
4.1 Obtención de extractos totales	45
4.2 Análisis de proteínas	45
4.2.1 Determinación de la concentración de proteínas	45
4.2.2 Electroforesis de proteínas en gel de poliacrilamida	45
4.2.3 Inmunodetección de proteínas	45
4.3 Gradientes de glicerol	46
4.4 Gradientes de ficoll	46
4.5 Experimentos de pulso y caza e inmunoprecipitación	47
4.5.1 Marcaje de las células con ³⁵ S-cisteína/metionina y caza	47
4.5.2 Inmunoprecipitación de las proteínas marcadas	47
4.6 Experimentos de protección a proteasas <i>in vitro</i>	48
4.7 Identificación de proteínas que interactúan con la región amino terminal de API	49
5. Estudios de interacción de proteínas mediante el sistema de dos híbridos	50
6. Análisis de supervivencia en ayuno de nitrógeno	50
7. Microscopía de fluorescencia	51
RESULTADOS	52
1. <i>Ssa1p</i> y <i>Ssa2p</i> , miembros de la familia de las <i>Hsp70</i> , interactúan con el extremo amino terminal de API	52
2. El transporte de pAPI a la vacuola está mediado por <i>Ssa1p</i>	55
3. <i>Ssa1p</i> no es necesaria para la dodecamerización de pAPI	58
4. pAPI permanece desprotegida en células $\alpha^{1^a}a234$	59
5. La proteína <i>Cvt19p</i> interactúa con API en un ensayo de dos híbridos	62
6. <i>Cvt19p</i> es necesaria para el transporte de API a la vacuola	64
7. <i>Cvt19p</i> no es necesaria para la dodecamerización de pAPI	66
8. pAPI permanece desprotegida en células $\Delta cvt19$	67
9. API no se asocia a membranas en células $\Delta cvt19$	68
10. <i>Cvt19p</i> no es esencial para la supervivencia a ayuno de nitrógeno	70
11. pAPI es capaz de alcanzar la vacuola en ayuno de nitrógeno en células $\Delta cvt19$	72
12. La proteína de fusión GFP- <i>Cvt19p</i> se acumula en estructuras redondeadas dentro del citosol	73
DISCUSIÓN	78
1. Interés del estudio del transporte de API	78
2. Búsqueda de proteínas que interactúan con API	80
3. Función de <i>Ssa1p</i> en el transporte de API a la vacuola	82
4. Función de <i>Cvt19p</i> en el transporte de API a la vacuola	84
CONCLUSIONES	90
BIBLIOGRAFÍA	91
ANEXO: Publicaciones	98

Abreviaturas:

APE1: gen que codifica la aminopeptidasa I de *Saccharomyces cerevisiae*

APG: conjunto de genes necesarios para el proceso de autofagia

API: producto génico del gen *APE1*. Alude a cualquiera de las formas en las que se encuentre la proteína; pAPI (forma precursora), iAPI (forma intermedia) o mAPI (forma madura). Aunque esta forma de nombrar la proteína difiere de las normas convencionales es la más utilizada en la literatura

BSA: albúmina de suero bovino

CVT: Cytoplasm-to-Vacuole Targeting, transporte desde el citoplasma a la vacuola (ruta de transporte de, al menos, API y α -manosidasa). Conjunto de genes necesarios para este proceso

dNTPs: mezcla equimolar de desoxiribonucleótidos trifosfato dATP, dTTP, dCTP y dGTP

DO: densidad óptica

DTT: ditioneitol

EDTA: ácido etilendiamino tetra-acético

FBPasa: fructosa-1,6 bisfosfatasa

FOA: ácido fluoro orótico

GFP: proteína verde fluorescente

IPTG: isopropil- β -D-tiogalactósido

LB: Luria broth

LBA: LB con ampicilina

MES: ácido 2-N-morfolino etanosulfónico

NSF: siglas en inglés del factor de fusión sensible a N-etilmaleimida

ONPG: orto-nitro-fenil-galactopiranosido

PBS-BS: PBS con una concentración baja de sal; tampón PBS (phosphate buffered saline) que se suplementó con 0,15 M NaCl

PCR: reacción en cadena de la polimerasa

PIPES: piperazina-N,N'-bis [ácido etanosulfónico]

PMSF: fluoruro de fenil-metil-sulfonato

PVDF: fluoruro de polivinilideno

SD: medio mínimo sintético

SD(-N): medio de ayuno de nitrógeno

SDS: dodecil sulfato sódico

SNAP: siglas en inglés de la proteína a la que se ancla NSF

SNARE: siglas en inglés del receptor de SNAP

t-SNARE: SNARE de la membrana receptora

v-SNARE: SNARE de la vesícula

YPD: extracto de levadura, peptona y glucosa

X-Gal: 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido

Resumen
Summary

Resumen

La aminopeptidasa I (API) de *Saccharomyces cerevisiae* es una enzima vacuolar que llega a este orgánulo por una vía de transporte vesicular diferente de la ruta secretora clásica. API se sintetiza en el citoplasma y es transportada a la vacuola en el interior de vesículas llamadas vesículas cvt o autofagosomas, según las condiciones metabólicas en que se encuentre la célula. El extremo amino terminal de la proteína API es determinante para su localización en estas vesículas. Para encontrar proteínas implicadas en este sistema de transporte, decidimos buscar aquéllas que interaccionaran *in vitro* con el extremo amino terminal de API, o *in vivo*, utilizando el sistema de doble híbrido.

En el estudio *in vitro* se detectó la interacción de las chaperonas citosólicas de la familia de Hsp70, Ssa1p y Ssa2p, con la región amino terminal. Mediante el uso de un mutante portador de un alelo termosensible del gen *SSA1* y carente del resto de los genes *SSA*, se pudo demostrar que la proteína Ssa1p es requerida *in vivo* para el transporte de API a la vacuola en un paso previo a la formación de las vesículas transportadoras.

Utilizando el sistema de doble híbrido, confirmamos y caracterizamos la interacción entre API y una proteína, codificada por el gen *YOL082w*, entonces de función desconocida. El estudio del fenotipo de un mutante en dicho gen permitió demostrar la implicación de esta proteína, que se denominó Cvt19p, en la ruta de API a la vacuola. Los datos obtenidos nos permiten proponer que la proteína Cvt19 es necesaria para la carga selectiva de API en las vesículas cvt y en los autofagosomas.

Summary

The *Saccharomyces cerevisiae* vacuolar enzyme aminopeptidase I (API) is targeted to the vacuole by a vesicular transport system different from the classical secretory pathway. API is synthesized in the cytosol as a precursor and transported to the vacuole by double membrane vesicles, cvt vesicles or autophagosomes. The amino terminus of API is required for the targeting of API to the vacuole. In searching for proteins involved in this transport system we looked for proteins interacting *in vitro* with the amino terminal part of API or *in vivo* by using the two hybrid system.

We detected two proteins interacting *in vitro* with the amino terminus of API: Ssa1p and Ssa2p, members of the Hsp70 chaperone family. The use of a strain containing a thermosensitive allele of *SSA1* gene and lacking the other *SSA* genes, made possible to demonstrate the role of Ssa1p in the transport of API to the vacuole, in a step before the formation of the transport vesicles.

By using the two hybrid system we confirmed and characterized the interaction between API and a protein of unknown function coded by the *YOL082w* gene. We analyzed the phenotype of a strain lacking this gene and determined the involvement of this protein, called Cvt19p in the process of API transport. The data we obtained led us to propose that this protein is necessary for the selective load of API in cvt vesicles or in autophagosomes.

Introducción

Introducción

1. Principios básicos del transporte y distribución intracelular de proteínas

Una de las características clave que definen a las células eucariotas es la compartimentación, que permite regular las funciones intracelulares favoreciendo una mayor eficiencia de los sistemas enzimáticos y separando en distintos orgánulos reacciones que, de otro modo, serían incompatibles. Esta ventaja reguladora ha obligado a la célula eucariótica a desarrollar procesos específicos que aseguren la distribución¹ intracelular adecuada de las proteínas y substratos que son propios de un orgánulo. La distribución y el transporte intracelular deben ser ordenados, de manera que se mantenga la identidad de cada compartimento.

Existen básicamente tres modos de transporte intracelular de proteínas: la translocación directa a través de una membrana, el transporte vesicular y el transporte a través de poros al que no haremos mención en esta memoria. Las proteínas que son translocadas para entrar en un orgánulo deben atravesar un canal proteico especializado en permitir el paso de proteínas de un lado de una membrana al otro (Fig. 1). Es necesaria para ello una señal en

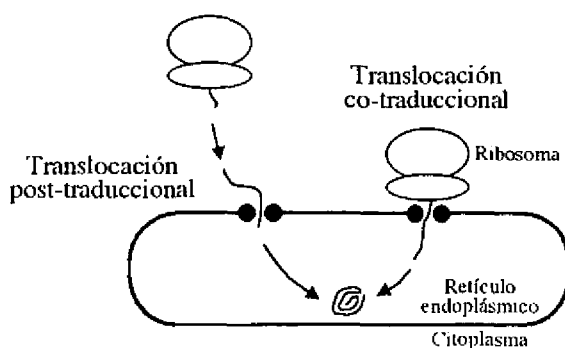


Fig. 1 Translocación de proteínas a través de membranas. Para entrar en el interior de un orgánulo desde el citoplasma las proteínas deben atravesar un canal proteico con una estructura desplegada que le permita el paso a través de este. Las proteínas que entran en el RE pueden hacerlo de forma coordinada con su síntesis en el ribosoma (translocación co-traducciona).

¹ En esta Tesis se empleará la palabra distribución como traducción del término inglés, empleado en la literatura, sorting.

la proteína que va a ser translocada que es reconocida por una proteína receptora (Schatz y Dobberstein; 1996). Ejemplos de este tipo de transporte son la entrada al retículo endoplásmico (RE) de las proteínas que viajan por la ruta secretora o la translocación a la mitocondria, peroxisomas o cloroplastos de aquellas proteínas cuyos genes correspondientes son nucleares.

En el transporte vesicular, por el contrario, las proteínas son, generalmente, transportadas de un compartimento a otro en el interior, o insertadas en la membrana, de una vesícula transportadora (Fig. 2). Una membrana donadora enriquecida con las proteínas que van a ser transportadas se deforma y, por escisión, da lugar a una vesícula cargada. Esta vesícula ha de fusionarse a continuación con una membrana aceptora de manera que el contenido es liberado a un nuevo orgánulo (o a otro compartimento dentro de un mismo orgánulo). De esta manera son transportadas tanto las proteínas como las membranas que forman las vesículas (Mellman y Warren, 2000).

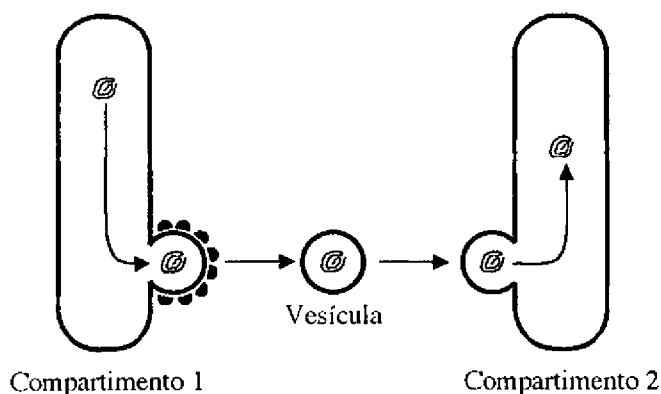


Fig. 2 Transporte vesicular. Además de la translocación, otra posibilidad para transportar proteínas intracelularmente es en el interior de vesículas que viajan de un compartimento, o de un orgánulo, a otro. Generalmente la vesícula que se forma, con la ayuda de proteínas de cubierta, selecciona la carga de proteínas.

Existen casos particulares dentro del transporte vesicular en los que las vesículas no se forman a partir de un orgánulo donador sino en el citoplasma (Abeliovich y Klionsky, 2001). Así ocurre en el transporte de proteínas desde el citoplasma al lisosoma o vacuola tanto en levaduras como en células de mamífero. En esta Introducción, en la que describiremos las rutas de distribución intracelular de proteínas haciendo hincapié en *Saccharomyces cerevisiae*, nos centraremos inicialmente en el tráfico de proteínas a través de la ruta secretora, un caso en el que se da el transporte por translocación y el transporte vesicular convencional.

2. Transporte y distribución intracelular de proteínas en la ruta secretora

La ruta de transporte intracelular más clásica y también la más transitada es la ruta secretora (Fig. 3). En un primer paso las proteínas son translocadas selectivamente al lumen del RE o insertadas en la membrana de este orgánulo en el caso de las proteínas con dominios

transmembrana. Desde el RE se produce el transporte vesicular hacia el aparato de Golgi. En estos dos orgánulos las proteínas pueden sufrir modificaciones covalentes tales como la proteólisis del péptido señal, la glicosilación y el anclaje a membrana mediante glicosil fosfatidil inositol (GPI) (Vida y col., 1991). En el aparato de Golgi debe “decidirse” el destino de cada proteína en el siguiente paso de transporte vesicular, decisión que depende de las señales contenidas en la secuencia de la propia proteína (Mellman y Warren, 2000). Las posibilidades son: 1. otro compartimento dentro del aparato de Golgi; 2. el endosoma y desde este a la vacuola; 3. la membrana plasmática, donde las proteínas solubles son secretadas al espacio periplásmico y las proteínas de membrana se sitúan en la membrana plasmática. El endosoma es también el punto de llegada de las vesículas que se han internalizado desde la membrana plasmática y cuyas proteínas son degradadas en el lisosoma o vacuola.

2.1 Etapas en la ruta secretora

Los principales cometidos que tiene que afrontar la célula para transportar y distribuir correcta y eficazmente las proteínas que viajan por la ruta secretora son esencialmente la entrada dentro del RE de las proteínas desde el citoplasma, la formación de las vesículas de transporte, la selección de su carga proteica y la fusión de las vesículas a la membrana receptora adecuada. A continuación se analizarán brevemente cada una de estas etapas.

2.1.1 Entrada de las proteínas desde el citoplasma al retículo endoplásmico

La translocación al RE puede producirse co-traduccionalmente, es decir, las proteínas son translocadas al mismo tiempo que la cadena polipeptídica está siendo sintetizada por el ribosoma, o post-traduccionalmente, después de la síntesis, como es frecuente en el caso de las levaduras (Fig. 4). Para ser translocadas a un orgánulo las proteínas deben atravesar la membrana de este con una conformación tal que sean capaces de entrar a través de un canal proteico hidrofílico, especializado en permitir la translocación de proteínas de un lado de una membrana al otro. Es necesaria, para que este proceso pueda realizarse, una señal en la proteína que va a ser translocada, un sistema que la transporte hacia la membrana por donde se va a translocar, un canal heterooligomérico (translocón) por el que la proteína va a pasar, un motor que, con el gasto de ATP o GTP, proporcione la energía necesaria para que la proteína sea translocada y un sistema que permita el plegamiento de las proteínas a la salida del translocón (Schatz y Dobberstein, 1996).

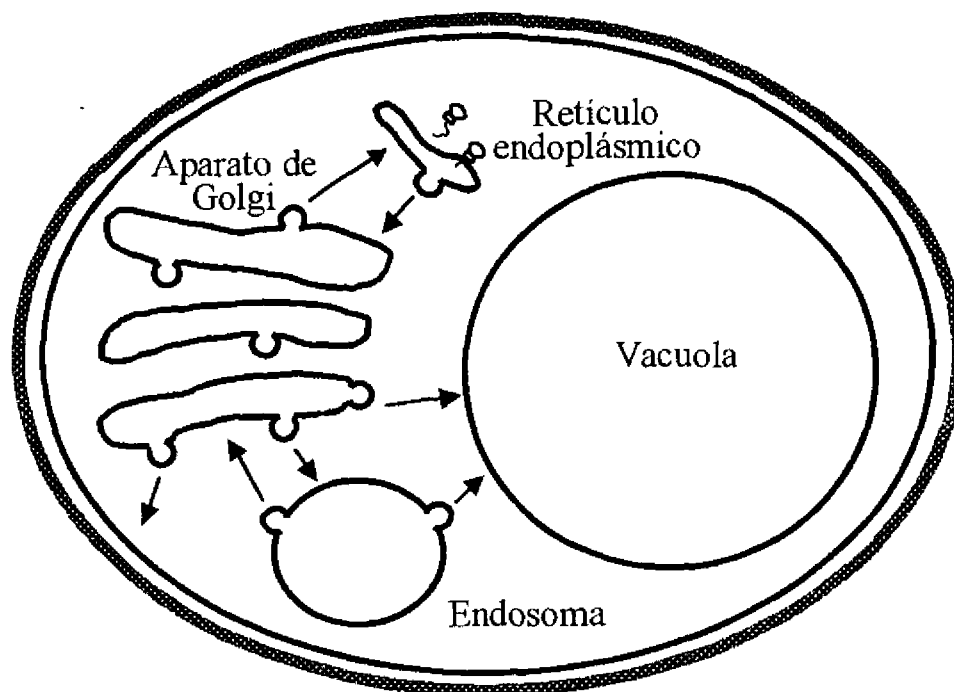
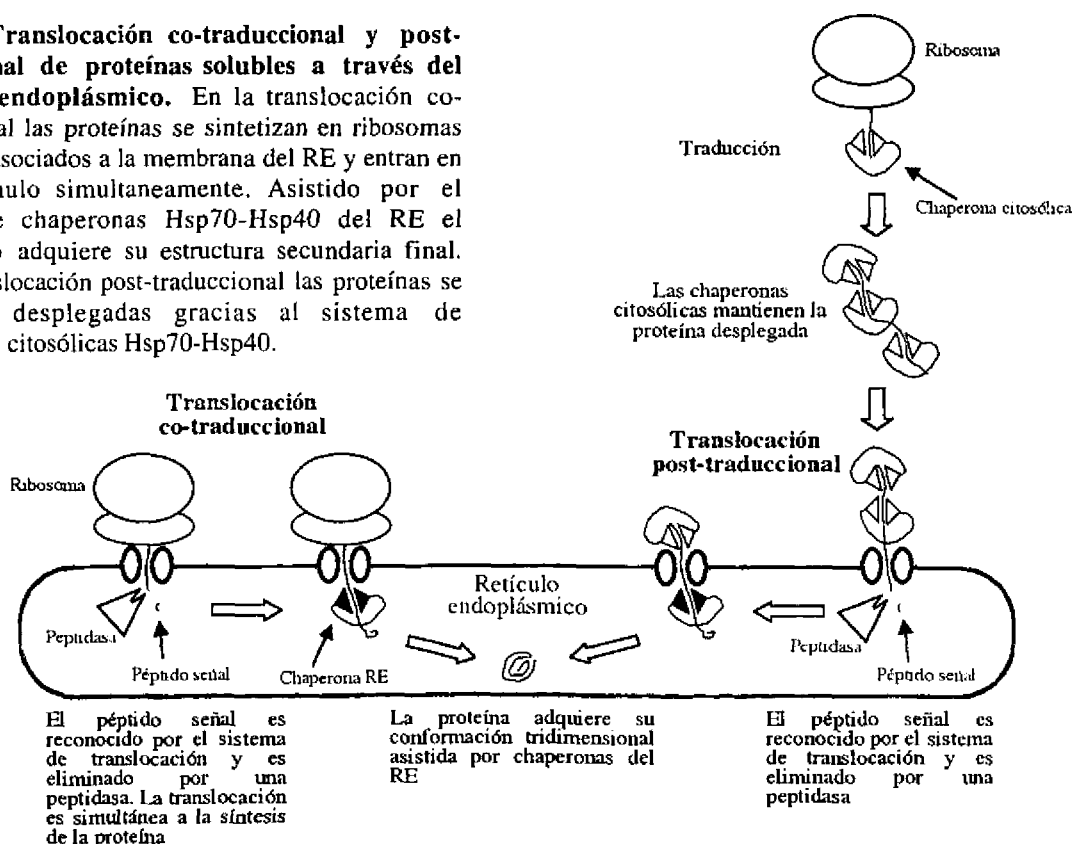


Fig. 3 Esquema general de la ruta secretora. Las proteínas que tienen una secuencia o péptido señal de entrada en el RE son translocadas a través de este. Dentro de la ruta secretora las proteínas son distribuidas según las señales que contengan. Las que viajan a la vacuola son transportadas al aparato de Golgi y desde este se dirigen al endosoma (aunque no todas las proteínas pasan por el endosoma) y a la vacuola. Muchas proteínas son secretadas mediante vesículas que se originan en el aparato de Golgi. Además, para regular la composición de estos orgánulos las rutas de transporte retrógrado permiten la formación de vesículas que se dirigen desde unos orgánulos a los anteriores en la ruta secretora (por ejemplo desde el aparato de Golgi al RE).

Fig. 4 Translocación co-traduccional y post-traduccional de proteínas solubles a través del retículo endoplásmico. En la translocación co-traduccional las proteínas se sintetizan en ribosomas que están asociados a la membrana del RE y entran en este orgánulo simultáneamente. Asistido por el sistema de chaperonas Hsp70-Hsp40 del RE el polipéptido adquiere su estructura secundaria final. En la translocación post-traduccional las proteínas se mantienen desplegadas gracias al sistema de chaperonas citosólicas Hsp70-Hsp40.



Las proteínas que se translocan co-traduccionalmente son dirigidas a la membrana del RE por el complejo SRP (del inglés, *signal recognition particle*) que es capaz de reconocer la secuencia señal (Schatz y Dobberstein, 1996). En el caso de la translocación post-traducciona son necesarias las chaperonas citosólicas de la familia de las Hsp70, en colaboración con las de la familia de las Hsp40, que facilitan que la proteína se encuentre en una conformación parcialmente desplegada que permita atravesar el canal. Una vez que la proteína está dentro del RE debe volver a adquirir su conformación nativa y para ello es importante la colaboración de las chaperonas de retículo Hsp70 y Hsp40 (Corsi y Schekman, 1996). Generalmente las chaperonas de la familia de las Hsp70 se unen a las proteínas a través de los residuos hidrofóbicos que exponen al estar desplegadas. Estas chaperonas tienen actividad ATPasa de manera que al unir su sustrato hidrolizan ATP pasando de una conformación abierta, en la que el sustrato puede entrar y salir de su sitio de unión, a una conformación cerrada en la que el sustrato no puede salir. El intercambio de ADP por ATP permite la salida del sustrato para ser translocado o para adquirir su conformación nativa cuando ha alcanzado el lumen del RE. Los sistemas Hsp70-Hsp40, participan además en multitud de procesos celulares como por ejemplo protección de diversos tipos de estrés que pueden ocasionar el mal plegamiento y agregación de proteínas (Bukau y Horwich, 1998).

2.1.2 Formación de las vesículas de transporte

La formación de las vesículas, que ocurre simultáneamente a la selección de las proteínas que van a progresar por la ruta secretora, requiere que la membrana que va a gemar se rodee de proteínas de revestimiento o cubierta (*coat proteins*, en inglés). Las etapas necesarias para una eficiente formación de vesículas son esencialmente las siguientes: deformación de la membrana, captura de la carga proteica de la vesícula, formación de la vesícula por escisión de la membrana y separación de las proteínas de cubierta que serán recicladas (Fig. 5).

Existen 3 tipos de vesículas que participan en distintos pasos de transporte según las proteínas de cubierta que tengan: complejo COPI, complejo COPII y oligómeros de clatrina. En los tres casos el proceso se inicia gracias a que una proteína citosólica con actividad GTPasa, perteneciente a la familia de las proteínas G pequeñas, se une a la membrana, siendo esta unión dependiente de una proteína de membrana estimuladora del intercambio GDP-GTP en la proteína G. Esta proteína, que constituye un ejemplo paradigmático, puede iniciar el reclutamiento de: 1. proteínas de la cubierta, que van a producir la deformación de la

membrana que posteriormente dará lugar a la vesícula; 2. proteínas adaptadoras entre la carga (o los receptores de esta) y las proteínas de la cubierta (sólo en el caso de las vesículas cubiertas de clatrina); 3. proteínas receptoras, que van a unir la carga de la vesícula, en el caso de las proteínas solubles; 4. proteínas de carga transmembrana, que se van a unir directamente a las proteínas de la cubierta; 5. proteínas de tipo v-SNARE, necesarias para la posterior unión de las vesículas al orgánulo receptor. En el caso de las vesículas recubiertas de clatrina estas se escinden de la membrana donadora gracias a la intervención de la dinamina que cierra el cuello de la vesícula naciente para liberarla. Este elemento no parece necesario para la formación de las vesículas de tipo COPII y COPI (Kirchhausen, 2000).

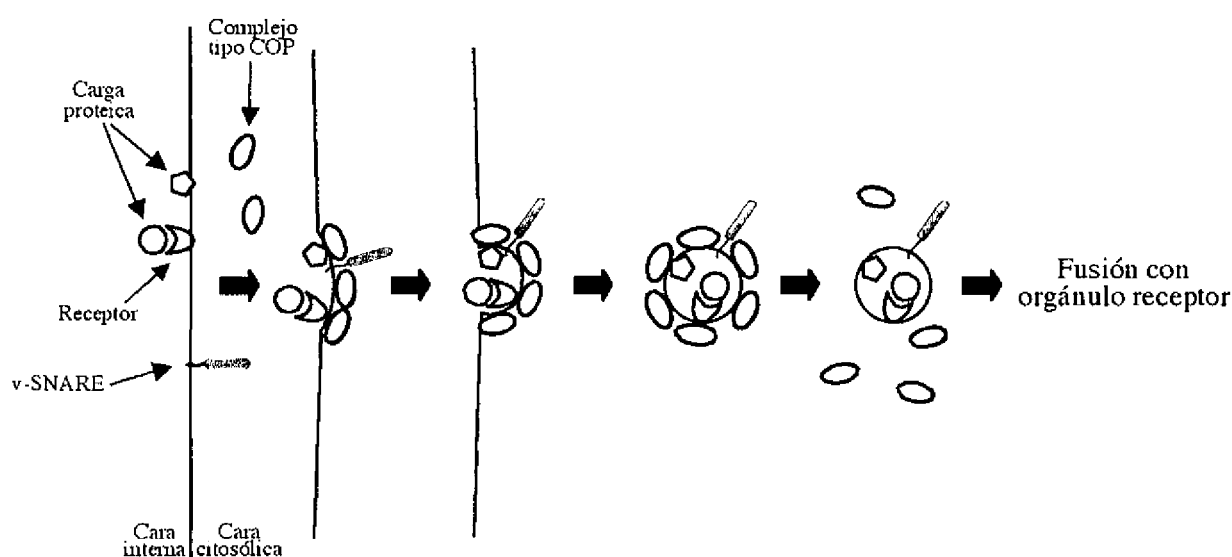


Fig. 5 Formación de vesículas de transporte. Las etapas necesarias para la formación de vesículas son esencialmente las siguientes: deformación de la membrana gracias a la unión de las proteínas de cubierta, captura de la carga proteica de la vesícula, formación de la vesícula por escisión de la membrana y separación de las proteínas de cubierta que serán recicladas

2.1.3 Selección de la carga proteica de las vesículas de transporte

La selección de las proteínas de un compartimento que van a viajar a otro parece estar regulada, aunque existen excepciones, por señales en las secuencias aminoacídicas de dichas proteínas que van a propiciar su incorporación a la vesícula que se está formando (Rothman y Wieland, 1996). Así ocurre, por ejemplo, en el caso de las proteínas que se encuentran en el lumen del aparato de Golgi y son reclutadas para su transporte al siguiente orgánulo en la ruta secretora gracias a la acción de proteínas adaptadoras que reconocen una secuencia determinada en las proteínas (Donaldson y Lippincott-Schwartz, 2000). En el RE existe un mecanismo de control adicional mediante el cual aquellas proteínas que estén mal plegadas no

progresarán hacia al aparato de Golgi sino que serán retrotransportadas para ser finalmente degradadas en el citoplasma (Bonifacino y Weissman, 1998).

A pesar del sistema de selección que acabamos de mencionar existen proteínas residentes en un compartimento que, ocasionalmente, pueden encontrarse en el siguiente compartimento de la ruta secretora. Entre estas proteínas podemos distinguir dos tipos: 1. las que se han incorporado "por error" a una vesícula de transporte y 2. aquellas que forman parte de la maquinaria de transporte cuya función es viajar de un compartimento a otro (por ejemplo en el caso de receptores de la carga de las vesículas). Una de las funciones del transporte retrógrado que existe entre determinados compartimentos (por ejemplo, vesículas que viajan del aparato de Golgi al RE) consiste en recuperar estas proteínas. Para ello las proteínas constitutivas de un orgánulo pueden tener una secuencia de recuperación o de regreso que es reconocida por los receptores de las vesículas del transporte retrógrado (Mellman y Warren, 2000).

La selección de la carga de las vesículas, que hemos visto en el párrafo anterior, también es utilizada por la célula para "decidir" hacia donde se va a dirigir una proteína. Así, en el aparato de Golgi se forman vesículas que van a dirigirse a la membrana plasmática, vesículas cuyo destino es el endosoma e incluso vesículas cuyo destino es la vacuola. Estas vesículas tienen la información necesaria para dirigirse a un lugar o a otro (ver el siguiente apartado).

2.1.4 Fusión de la vesícula de transporte a la membrana y especificidad de esta

Para la fusión de las vesículas, que se han liberado de las proteínas de la cubierta una vez completada su formación, con los orgánulos aceptores, son necesarias una serie de proteínas citosólicas, asociadas a la membrana de la vesícula o integrales de membrana. La interacción de las proteínas v-SNARE, asociadas a la vesícula, con las t-SNARE, asociadas a la membrana del orgánulo aceptor, permitirá el anclaje de la vesícula a la membrana receptora adecuada y, en un paso posterior, se producirá la fusión entre las membranas (Fig. 6). Como norma general las proteínas t-SNARE van a unirse no covalentemente con la proteína v-SNARE formando una estructura de cuatro α -hélices enrolladas entre sí (más conocida por el término coiled-coil) (Skehel y Wiley, 1998). Las dos proteínas t-SNARE que forman parte de este complejo pertenecen a las familias de la syntaxina y de SNAP-25 respectivamente, mientras que la proteína v-SNARE pertenece a la familia de la sinaptobrevina. La especificidad de la unión entre vesículas no está, al menos no totalmente, asegurada por estas

proteínas a pesar de que cada orgánulo, o las vesículas derivadas de cada orgánulo, tiene, generalmente, sus v- y t-SNAREs diferentes. Las GTPasas de la familia Rab/Ypt, que ponen en contacto en un paso previo, y reversible, a vesícula y orgánulo, parecen ser el elemento que confiere parte de la especificidad aunque sea un aspecto que todavía está en discusión (Schimmöller y col., 1998).

Después de la fusión de las membranas las SNAREs deben separarse para permitir nuevos ciclos de fusión de vesículas. Los principales responsables de esta disociación son las proteínas α -SNAP y NSF (en levadura Sec17p y Sec18p respectivamente) (Götte y Fischer von Mollard, 1998).

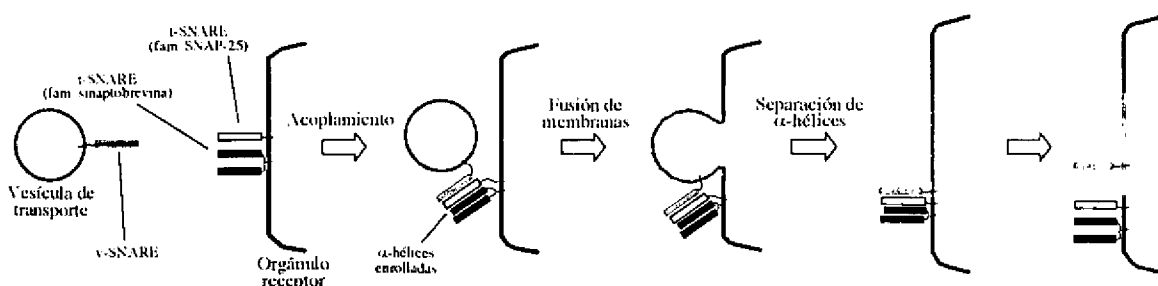


Fig. 6 La fusión de proteínas al orgánulo diana está mediada por las proteínas tipo v- y t-SNARE. El transporte vesicular está mediado y regulado, entre otros componentes, por los v-SNAREs y t-SNAREs. Estas proteínas asociadas a membrana vesicular o del orgánulo receptor son necesarias, junto a otras como las de la familia de Rab5, para unir de forma específica e irreversible la vesícula con la membrana receptora. Para que esto ocurra dos proteínas t-SNARE diferentes y una v-SNARE se asocian formando una estructura de 4 α -hélices enrolladas (coiled-coils). Cuando la fusión entre las vesículas se ha producido las proteínas de tipo SNARE deben desensamblarse, con la ayuda de las proteínas de la familia NSF/Sec18 y α -SNAP/Sec17, para poder participar en nuevas rondas de fusión de vesículas.

3. Rutas de transporte a la vacuola de *Saccharomyces cerevisiae*

La vacuola de la levadura (análoga al lisosoma en células de mamífero) es un orgánulo de gran importancia en la fisiología del organismo. Entre sus funciones está la de regulación osmótica y del pH, la degradación de proteínas en diversas condiciones metabólicas y el almacenamiento de aminoácidos, pequeños iones y polifosfatos (Pringle y col., 1997). Para llevar a cabo estas funciones es necesario que la célula asegure el transporte de proteínas a este orgánulo, tanto de proteínas residentes como de los substratos que van a ser degradados (Bryant y Stevens, 1998). La mayoría de las proteínas residentes llegan a la vacuola por la ruta secretora. Sin embargo, algunas de las proteínas residentes en la vacuola utilizan rutas alternativas con ciertas modificaciones sobre la ruta secretora, o completamente diferentes

3.1.2 Ruta cvt

La aminopeptidasa I (API) y la α -manosidasa (Ams1p) son enzimas vacuolares que viajan constitutivamente a este orgánulo desde el citoplasma (de ahí las siglas del inglés, Cytoplasm-to-Vacuole Targeting del nombre de la ruta) en vesículas de doble membrana (ver más adelante) (Abeliovich y Klionsky, 2001). La ruta cvt es por tanto una ruta biosintética que sirve para la distribución intracelular de dos proteínas residentes.

3.2 Rutas de transporte de proteínas que son degradadas en la vacuola

3.2.1 Macroautofagia

La macroautofagia, comunmente denominada autofagia, es un sistema de degradación de componentes citosólicos que se induce en condiciones de ayuno de nutrientes. Vesículas de doble membrana engloban porciones del citoplasma, que incluso incluyen orgánulos como la mitocondria, y las dirigen al interior de la vacuola (ver más adelante) (Abeliovich y Klionsky, 2001).

3.2.2 Pexofagia

La pexofagia es una ruta de degradación de peroxisomas en levaduras como *Pichia pastoris*, *Hansenula polymorpha*, *Yarrowia lipolytica* o *Saccharomyces cerevisiae* que sirve para regular su presencia según lo requiera el metabolismo de la célula (Kim y Klionsky, 2000). En presencia de ácidos grasos como fuente de carbono se induce la biogénesis de este orgánulo, que participa en su metabolización. Si las células de *Saccharomyces cerevisiae* se transfieren a medio con glucosa como fuente de carbono o a medio sin fuente de nitrógeno, se induce un tipo de pexofagia, la macropexofagia, mediante la cual los peroxisomas son englobados por estructuras de doble membrana similares a las de los autofagosomas. Muchos de los genes necesarios para la autofagia también lo son para la pexofagia. Existe sin embargo una diferencia importante entre ambos procesos: en la macropexofagia el transporte del peroxisoma a la vacuola parece ser específico ya que ocurre más rápidamente que el importe de proteínas al azar por los autofagosomas (Guan y col. 2001).

3.2.3 Ruta degradativa de la FBPasa

La FBPasa, enzima gluconeogénica citosólica, puede ser transportada a la vacuola cuando se transfieren las células desde medio sin glucosa a medio con glucosa. Esta enzima está altamente regulada de manera que en presencia de este azúcar la expresión de su gen está

reprimida (Gancedo, 1992), la enzima se inactiva (Gancedo, 1971) y es degradada en la vacuola. El proceso de degradación, todavía no bien conocido, supone que la FBPasa es englobada por una membrana, de origen desconocido, que forma una vesícula que se fusiona con la membrana de la vacuola liberando el contenido al interior, donde se degrada (Chiang y Schekman, 1991). Además de la degradación en la vacuola existe evidencia de que la FBPasa puede ser degradada por el proteosoma en el citosol (Schork y col., 1995).

4. Transporte de la Aminopeptidasa I a la vacuola

El objetivo de esta tesis es el estudio de una ruta no convencional de transporte de proteínas a la vacuola como es el caso de la ruta que sigue la aminopeptidasa I. El análisis de la ruta que utiliza esta proteína para viajar a la vacuola, aporta una visión alternativa de los sistemas de transporte tradicionales como la ruta secretora, facilitando su comprensión y estudio. Además la similitud entre esta ruta y la autofagia permite utilizar la ruta cvt como modelo y la aminopeptidasa I como marcador para esta vía de transporte inespecífica. A continuación se describe el modelo de transporte y algunos de los componentes requeridos en esta ruta. Al inicio de esta tesis se desconocían muchos de los hechos que se muestran a continuación.

4.1 La Aminopeptidasa I utiliza una ruta alternativa para viajar a la vacuola

La aminopeptidasa I (que habitualmente se denomina API) es una hidrolasa vacuolar soluble (código internacional de actividades enzimáticas, EC= 3.4.11.22) de *Saccharomyces cerevisiae* que está codificada por el gen *APEI* (también conocido como *LAPIV*). API es una exopeptidasa que pertenece a la familia de las metaloproteasas (Jones, 1991) e hidroliza aminoácidos sin carga o hidrofóbicos, preferentemente leucina, en el extremo amino terminal de las proteínas sustrato por lo que también se denomina Leucina-Aminopeptidasa I. La interrupción del gen *APEI* en la levadura no produce ningún fenotipo evidente, ni siquiera en ayuno de fuente de nitrógeno, situación en la que se induce la degradación de proteínas en la vacuola (ver más abajo) y en la que *APEI* se induce en una cepa silvestre. Quizá esto se deba a la variedad de proteasas presentes en la vacuola, incluidas otras aminopeptidasas que producen una alta redundancia funcional (Jones, 1991; Klionsky y col., 1992). La proteína codificada por el gen *APEI* tiene un tamaño molecular de 61 kDa, sin embargo en la vacuola es procesada a una forma de 50 kDa (Klionsky y col., 1992). La maduración de la proteína consta de dos fases: en la primera la proteína precursora (pAPI) es procesada a una forma

intermedia de 55 kDa (iAPI) y en la segunda alcanza su tamaño maduro (mAPI) (Seguí-Real y col., 1995). En estos dos pasos son eliminados los 45 aminoácidos amino terminales de la proteína que constituyen por tanto un pre-pro-péptido señal. Esta maduración es dependiente de las proteasas vacuolares Pep4p y PrB (o proteasas A y B, respectivamente) (Klionsky y col., 1992; Seguí-Real y col., 1995). El procesamiento que acabamos de describir implica que la detección de la proteína en la forma madura indica que esta se encuentra en la vacuola por lo que es un marcador del funcionamiento de la ruta (Fig. 8). La información que se puede deducir de la secuencia aminoacídica de API no sugiere que tenga una secuencia señal de entrada en la ruta secretora de transporte a través del RE ni una secuencia consenso para el procesamiento de una secuencia señal. API no está glicosilada, lo cual sería indicativo de su paso por el aparato de Golgi, y su tiempo medio de procesamiento (aproximadamente unos 45 minutos) es muy largo comparado con el de otras proteínas que van a la vacuola a través de la ruta secretora (Klionsky y col., 1992). Se ha comprobado además que la sobreexpresión de API no produce su secreción al espacio periplásmico como ocurre con otras proteínas vacuolares solubles que viajan a la vacuola por la vía clásica cuando se sobreexpresan. Estos hechos parecían indicar que API no llega a la vacuola utilizando la ruta secretora sino por alguna ruta alternativa. Este extremo se confirmó mediante el estudio del transporte de API en mutantes en distintos pasos en la ruta secretora en los que se observó que el transporte de la aminopeptidasa no estaba bloqueado (Klionsky y col., 1992).

La proteína vacuolar α -manosidasa también viaja a la vacuola por una ruta alternativa a la secretora (Yoshihisa y Anraku, 1990). Se ha demostrado recientemente que ambas proteínas comparten la misma vía de transporte (Hutchins y Klionsky, 2001) como se había propuesto debido al hecho de que la sobreexpresión de α -manosidasa retrasa el transporte de pAPI a la vacuola (Klionsky y col., 1992).

La región amino terminal de la proteína, precisamente la que es eliminada a la entrada en la vacuola, es necesaria para el transporte de API a este orgánulo. Esta señal de 45 aminoácidos, cuya secuencia en código de una letra es MEEQREILEQLKKTLLQMLTVEPSKNNQIANEEKEKKENENSWCIL, podría tener una estructura de dos α -hélices separadas por un giro β , según la predicción de Chou y Fasman (Oda y col., 1996). La primera de las α -hélices (desde el aminoácido 1 hasta el 17), de la que existe evidencia experimental de que en efecto tiene esta estructura (Martínez y col., 1997), tiene un carácter anfipático, con residuos básicos, ácidos y no cargados, pero polares, en un lado de la hélice y residuos hidrofóbicos al otro lado. La segunda α -hélice (desde el

aminoácido 25 hasta el 45) no tiene carácter anfipático. La delección total de alguna de las dos α -hélices impide el transporte de la proteína a la vacuola (Seguí-Real y col., 1995; Oda y col., 1996). La mutagénesis al azar o dirigida de este péptido señal reveló que las mutaciones puntuales que afectaban el transporte de pAPI se encontraban en la hélice anfipática (Oda y col., 1996; Martínez y col., 1997), a excepción de la mutación P22L, que rompía la estructura secundaria del giro β al substituir una prolina por una leucina. Los cambios que reducen la hidrofobicidad en la hélice anfipática o aquellos que rompen la estructura de α -hélice también afectan el transporte a la vacuola, así como la alteración de la periodicidad de esta hélice anfipática, mediante la inserción de una alanina en posición 11. En cambio, mutaciones puntuales en la segunda α -hélice e incluso delecciones de 3 aminoácidos no parecen alterar el procesamiento normal de la aminopeptidasa (Oda y col., 1996).

Después de su síntesis en el citoplasma API oligomeriza formando dodecámeros (Kim y col., 1997). La forma madura de la proteína también tiene esta estructura cuaternaria (Metz y col., 1977; Löffler y Röhm, 1979) y se cree que la dodecamerización de la proteína no es necesaria para el transporte sino para la actividad enzimática de la misma. Después de formarse los dodecámeros de API estos se organizan en una estructura de orden superior en la cual se asocian un número indeterminado de dodecámeros en los llamados complejos cvt (Baba y col., 1997). Poco se sabe acerca de la formación y composición de estas estructuras pero posiblemente también pueden contener oligómeros de α -manosidasa, proteína que, como ya hemos señalado, usa la misma ruta de transporte (Yoshihisa y Anraku, 1990; Hutchins y Klionsky, 2001). En el siguiente paso en el transporte de API los complejos cvt son rodeados por una estructura que va a formar una vesícula de doble membrana que los atrapa (Baba y col., 1997). Estas vesículas, denominadas cvt, viajan a la vacuola y fusionan su membrana externa con la membrana vacuolar, liberando al lumen una vesícula de membrana sencilla que es degradada para liberar API. En el interior de la vacuola, pAPI es procesada para dar lugar a su forma madura. Existe evidencia tanto bioquímica como de microscopía electrónica que apoya este modelo de transporte (Fig. 9) y que se ha ido recogiendo durante los últimos cinco años (revisado por Abeliovich y Klionsky, 2001).

4.2 La Aminopeptidasa I viaja a la vacuola dentro de vesículas de doble membrana

Son muchas, más de 30, las proteínas necesarias para el transporte de API. En una búsqueda de mutantes afectados en el transporte de API a la vacuola se encontraron hasta 17

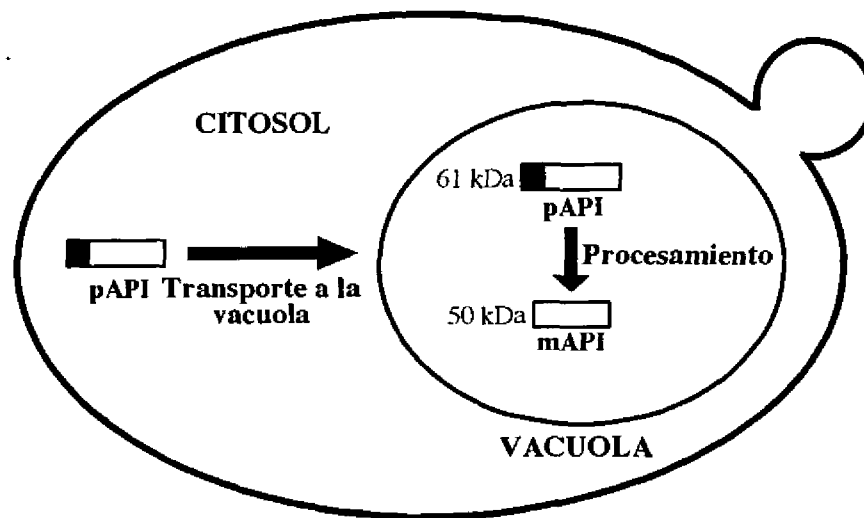


Fig. 8 Esquema del transporte de pAPI a la vacuola y su procesamiento. La aminopeptidasa I de *Saccharomyces cerevisiae* es sintetizada en el citoplasma como una forma precursora, pAPI, y es transportada a la vacuola. En el interior de la vacuola es procesada, mediante la eliminación del extremo amino terminal de manera dependiente de las proteasas vacuolares A y B, para convertirse en la forma madura.

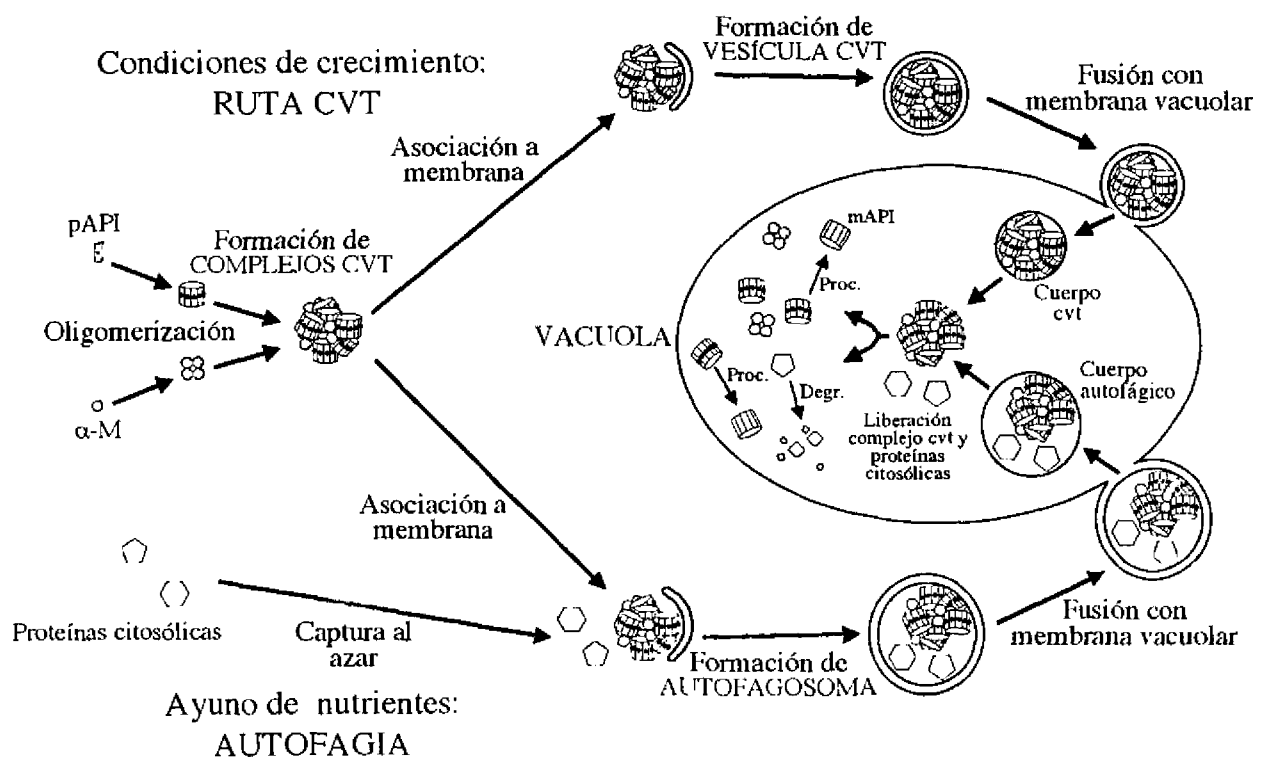


Fig. 9 Modelo del transporte de API a la vacuola. Después de su síntesis en el citosol como forma precursora, pAPI se organiza en dodecámeros que a su vez se asocian en los llamados cuerpos cvt. Posiblemente a esta estructura también se incorporen tetrámeros de α -manosidasa, proteína que emplea la misma ruta de transporte que API. Los cuerpos cvt se incorporan a estructuras de doble membrana, diferentes dependiendo de la situación metabólica de las células, para formar los autofagosomas o vesículas cvt. Estas vesículas liberan en el interior de la vacuola los cuerpos autofágicos o cvt que son degradados y su contenido es procesado o, en el caso del contenido citosólico, degradado por las hidrolasas vacuolares.

clones en los que pAPI no era procesada a la forma madura (Harding y col., 1995). Estos autores utilizaron un anticuerpo dirigido contra la región prepro de API para seleccionar mutantes de esta ruta que acumulaban la forma precursora. En la actualidad la mayoría de los genes portadores de esas mutaciones ya han sido clonados y se conocen como genes CVT. Sin embargo esta búsqueda de mutantes no debió ser saturante ya que se han encontrado aún más genes no esenciales necesarios para el transporte de API, por ejemplo, Cvt19p (Leber y col., 2001), Tlg2p y Vps45p (Abeliovich y col., 1999), Vac8p (Wang y col., 1998) o Vam3p (Darsow y col., 1997).

La gran mayoría de genes necesarios para el transporte de aminopeptidasa I a la vacuola también son necesarios para el proceso de autofagia (Harding y col., 1996; Scott y col., 1996). Este solapamiento es significativo fisiológicamente ya que parece demostrado que, en ambos procesos, el mecanismo mediante el cual proteínas que se encuentran presentes en el citoplasma son transportadas a la vacuola es, en términos generales, el mismo (Baba y col., 1997; Abeliovich y col., 2000).

La autofagia se desencadena en condiciones de ayuno de nutrientes, siendo el ayuno de fuente de nitrógeno el más utilizado para su estudio, y tiene como fin utilizar los componentes del citoplasma como fuente de nutrientes (Takeshige y col., 1992). Para ello, una doble membrana rodea una porción del citoplasma y se cierra sobre sí misma formando el autofagosoma, una estructura con un diámetro de entre 300 y 900 nanómetros aproximadamente (Baba y col., 1994). Por lo tanto el contenido de esta vesícula de transporte es obtenido al azar y puede incluir proteínas citosólicas e incluso orgánulos como mitocondrias (Fig. 10). El autofagosoma es dirigido hacia la membrana vacuolar y fusiona su membrana externa con ella liberando al interior de este orgánulo la membrana interna con su contenido citosólico (cuerpo autofágico). Las enzimas hidrolíticas vacuolares degradan la membrana del cuerpo autofágico y su contenido, que es utilizado por la célula como nutriente (Baba y col., 1994).

En estas condiciones de ayuno API es transportada dentro de los autofagosomas. Como hemos indicado anteriormente, en condiciones vegetativas API viaja a la vacuola dentro de vesículas de doble membrana similares a los autofagosomas pero más pequeñas, las vesículas cvt que liberan en el interior de la vacuola los cuerpos cvt (Baba y col., 1997). No se sabe si la composición de la membrana de estas dos estructuras es la misma pero parece que en el lumen de las vesículas cvt no se incluyen porciones de citoplasma al azar.

El transporte de API a la vacuola tanto en condiciones de crecimiento como de ayuno es específico; al contrario de lo que ocurre con el transporte de porciones de citoplasma por autofagia. La cinética de transporte de API a la vacuola en situación de ayuno de nitrógeno es considerablemente más rápida que la de la carga autofágica, proteínas que son transportadas para ser degradadas en la vacuola con una vida media superior a 12 horas (Scott y col., 1996). En cambio el tiempo medio de procesamiento de pAPI desde que se sintetiza en el citoplasma es de 30-45 minutos (Klionsky y col., 1992) incluso en condiciones de autofagia en las que API se induce casi 20 veces (Scott y col., 1996). Esta diferencia entre la velocidad de transporte de la carga autofágica y de API y el hecho de que el transporte de API sea dependiente de su extensión amino terminal sugieren que debe existir un receptor para API que asegure la especificidad en el transporte de esta proteasa a la vacuola, tanto en condiciones vegetativas como de ayuno de nutrientes.

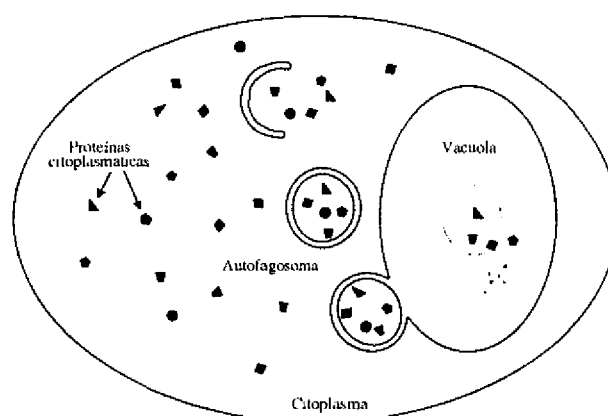


Fig. 10 Autofagia: Formación de los autofosomas y degradación del contenido. La autofagia se induce en condiciones de ayuno de nutrientes. Una estructura de doble membrana rodea una porción de citoplasma y forma un autofosoma. Este fusiona su membrana externa con la de la vacuola liberando al interior el cuerpo autofágico. La membrana y el contenido citoplasmático son degradados dentro de este orgánulo.

4.3 Análisis molecular del transporte de API en vesículas

A nivel molecular tan solo se conocen algunos aspectos acerca del mecanismo de transporte de la aminopeptidasa I a la vacuola. Quizá las etapas mejor entendidas son las correspondientes a los pasos finales del transporte, en los cuales las vesículas cargadas con API se fusionan a la membrana vacuolar y liberan la carga al interior de la vacuola. Parece claro que, a pesar de tratarse de una ruta de transporte diferente de la ruta secretora, la ruta cvt emplea muchos elementos comunes a esta, como por ejemplo aquellas proteínas requeridas para que se produzca la fusión entre orgánulos. En primer lugar haremos mención de estos

elementos comunes y después de elementos específicos de la ruta cvt, eso sí, muchas veces compartidos con la ruta de autofagia.

El citoesqueleto de tubulina está implicado en diferentes rutas de transporte vesicular y por lo tanto es un candidato a dirigir el transporte de las vesículas cvt o el de los autofagosomas desde su sitio de formación hasta la vacuola. El efecto de agentes despolimerizantes de microtúbulos como nocodazol y vimblastina sugiere, en células de mamífero, la implicación del citoesqueleto en la autofagia (Aplin y col., 1992; Seglen y col., 1996). Sin embargo en *Saccharomyces cerevisiae* se ha visto recientemente que el nocodazol no afecta al proceso de autofagia (Kirisako y col., 1999), por lo tanto, dada la homología entre los dos sistemas de transporte es probable que el citoesqueleto de tubulina no sea necesario para la ruta cvt. Vac8p, necesaria para el transporte cvt parece interactuar con el citoesqueleto de actina (Wang y col., 1998) pero dado que esta proteína interviene en numerosos procesos celulares no se puede asegurar la relación entre este citoesqueleto y el transporte de API, puesto que podría ocurrir que su interacción con el citoesqueleto fuera necesaria sólo para llevar a cabo alguna de sus funciones.

La fusión entre la vacuola y la vesícula que transporta pAPI se produce utilizando, tanto en condiciones de crecimiento como de ayuno de fuente de nitrógeno, el sistema de fusión entre vesículas análogo al que se da en la ruta secretora. Los miembros que intervienen en este proceso en este sistema de transporte pertenecen a familias altamente conservadas en eucariotas: Vam3p, Vam7p, Vti1p, Ypt7p y Sec18p (ver tabla 1). Además, estos componentes son también los elementos necesarios para la fusión de otros tipos de vesículas que transportan proteínas a la vacuola por la ruta secretora. En experimentos de protección a proteasas *in vitro* realizados con lisados de células mutantes en genes que codifican las proteínas anteriores, API se encuentra protegida de la degradación, un hecho experimental que se interpreta como que el precursor de API está ya en el interior de una vesícula. Por lo tanto esta técnica experimental, ya utilizada para el estudio de la ruta secretora (Blobel y Dobberstein, 1975), ha servido para clasificar a los mutantes como tempranos, es decir, anteriores al cerramiento de las vesículas, o tardíos, afectados en el transporte o fusión de vesículas a la vacuola.

Tabla 1. Algunas proteínas necesarias para la fusión de vesículas cvt o autofagosomas a la vacuola

PROTEÍNA	DESCRIPCIÓN	REFERENCIA
Vam3p	t-SNARE familia syntaxina	Dawson y col., 1997
Vam7p	t-SNARE familia SNAP-25	Sato y col., 1998
Vti1p	v-SNARE familia sinaptobrevina	Fischer von Mollard y Stevens, 1999
Ypt7p	Familia Rab-GTPasas	Klionsky, 1998
Sec18p	Familia NSF	Ishihara y col., 2001

Actualmente, a pesar de lo mucho que se ha avanzado en la identificación de componentes de la ruta cvt, no se conoce todavía el mecanismo mediante el cual se forma la estructura de doble membrana, ni cómo API es selectivamente dirigida a ella antes de que se cierre sobre sí misma. Sin embargo, algunos eventos que son necesarios para que la vesícula se forme son conocidos con bastante detalle. En los mutantes que están afectados en este proceso, pAPI es accesible a proteasas en un ensayo de protección a proteínasa K *in vitro*. Algunos de estos eventos se mencionan a continuación.

La búsqueda de mutantes en autofagia seleccionando células que pierden viabilidad en condiciones de ayuno de fuente de nitrógeno, y su estudio, hizo posible identificar proteínas implicadas en la biogénesis de vesículas cvt y autofagosomas (Tsukada y Ohsumi, 1993). El estudio de su función bioquímica permitió, por ejemplo, identificar un sistema de modificación de proteínas similar al de ubiquitinación. El sistema de modificación de Apg12p (Mizushima y col., 1998b) es necesario para la formación tanto de las vesículas cvt como de los autofagosomas (Fig. 11) así como para una eficiente modificación, unión a membrana y transporte a la vacuola en autofagosomas de Aut7p (Kim y col., 2001), proteína esencial para la formación del autofagosoma. En el sistema de Apg12p intervienen los siguientes componentes: Apg5p, Apg7p/Cvt2p, Apg10p, Apg12p y, en un paso posterior, Apg16p. Apg7p tiene una homología significativa con Uba1p, la proteína E1 que activa la ubiquitina. Del mismo modo que Uba1p, Apg7p hidroliza ATP y activa su sustrato, Apg12p en lugar de ubiquitina, formando un enlace tioéster con él (Tanida y col., 1999). En el sistema de la ubiquitina, en un segundo paso, una enzima de tipo E2 debe transferir el sustrato a la proteína que se modifica. En este caso Apg10p, que no tiene homología con la enzima correspondiente del sistema de la ubiquitina, une Apg12p mediante otro enlace tioéster y lo transfiere a Apg5p mediante un enlace isopeptídico entre la lisina 149 de esta y el carboxilo terminal de Apg12p. Apg5p es una proteína que está asociada en parte a membranas, por lo que al unirse a Apg12p también la lleva a la membrana. Apg16p es una proteína que se une a Apg5p cuando esta está unida a Apg12p. Puesto que además Apg16p es una proteína con

capacidad de formar homooligómeros, como consecuencia de todos estos procesos, se forma un heterooligómero de una tamaño molecular aproximado de 350 kDa (Kuma y col., 2002). La formación de este complejo es necesaria para la biogénesis de las vesículas cvt y los autofagosomas (Mizushima y col., 1999).

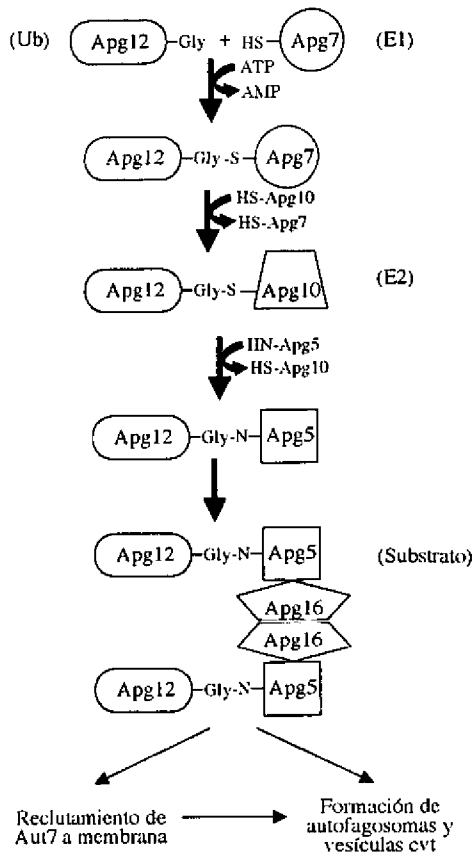


Fig. 11 Sistema de modificación de Apg12p. Este sistema de modificación es análogo al de ubiquitinación. En la figura se muestran en paréntesis, junto a las proteínas que participan en este sistema, el nombre genérico de las proteínas que cumplen un papel análogo en los sistemas de ubiquitinación. Apg12p se une a Apg7p formando un enlace tioéster. Ésta última es liberada y se une a Apg10p, formando el mismo tipo de enlace. En el siguiente paso Apg5p, unida a membrana y análoga a los sustratos a los que se une la ubiquitina, se une a Apg12p mediante un enlace de tipo amida. Finalmente Apg16p, capaz de oligomerizar, se une a Apg5p formandose de esta manera un heterooligómero que permanece unido a membrana. La formación de este hexámero es necesaria para la formación de autofagosomas y vesículas cvt y para el reclutamiento de Aut7p a membrana.

Como hemos mencionado anteriormente, el sistema de modificación de Aut7p es esencial para la formación de los autofagosomas y las vesículas cvt (Fig. 12). Como consecuencia de dicha modificación, Aut7p se localiza en la membrana que va a formar el autofagosoma o vesícula cvt en un estadio intermedio y posteriormente se disocia de la membrana y puede viajar a la vacuola dentro de los autofagosomas o las vesículas cvt siendo finalmente degradada (Kirisako y col., 2000). Para la localización de Aut7p en membrana es necesario que previamente se produzca la conjugación entre Apg5p, Apg12p y Apg16p (Kim y col., 2001). Este sistema también tiene similitudes con el sistema de ubiquitinación de proteínas (Ichimura y col., 2000). En un primer paso la arginina 117 situada en el extremo carboxilo terminal de Aut7p debe ser eliminada por Apg4p, una nueva proteasa de la familia de las cisteín proteasas. De esta manera se expone en el extremo carboxilo terminal de Aut7p una glicina, en posición 116, que forma en el siguiente paso un enlace tioéster con una

cisteína, en posición 507, de Apg7p (que actúa de manera análoga a las proteínas E1 que activan la ubiquitina y es dependiente de ATP). En el siguiente paso Aut7p es transferida a Aut1p (análoga a proteínas de tipo E2, que transfieren la ubiquitina a su sustrato, presenta cierta homología con Apg10p alrededor de la cisteína que forma el enlace tioéster). Aut1p cataliza la unión de Aut7p, mediante un enlace isopeptídico, con fosfatidiletanolamina (Kirisako y col., 2000; Ichimura y col., 2001). Aut7p modificada con fosfatidiletanolamina (Aut7p-PE) tiene una gran afinidad por la membrana.

La expresión de la forma truncada de Aut7p (terminada en Gly) en lugar de la forma silvestre no complementa el fenotipo producido por la ausencia de Apg4p, a pesar de lo dicho anteriormente. Mediante estudios *in vitro* se observó que Apg4p no sólo elimina la arginina terminal de la proteína sino que además es necesaria para romper el enlace que une Aut7p a fosfatidiletanolamina, volviendo a conferir un carácter soluble a la proteína (Kirisako y col., 2000). Esto parece indicar que Aut7p puede entrar en un ciclo de unión y separación de la membrana que es necesario para el correcto funcionamiento tanto de la autofagia como de la ruta de transporte cvt. No se conoce en qué casos Aut7p entra en este ciclo aunque se ha propuesto que depende de su situación topológica en la membrana a la que se ha unido (Reggiori y Klionsky, 2002). Aunque no se conoce cual es la función de Aut7p y de su conjugación a este lípido, está claro que esta proteína, cuya expresión se induce en

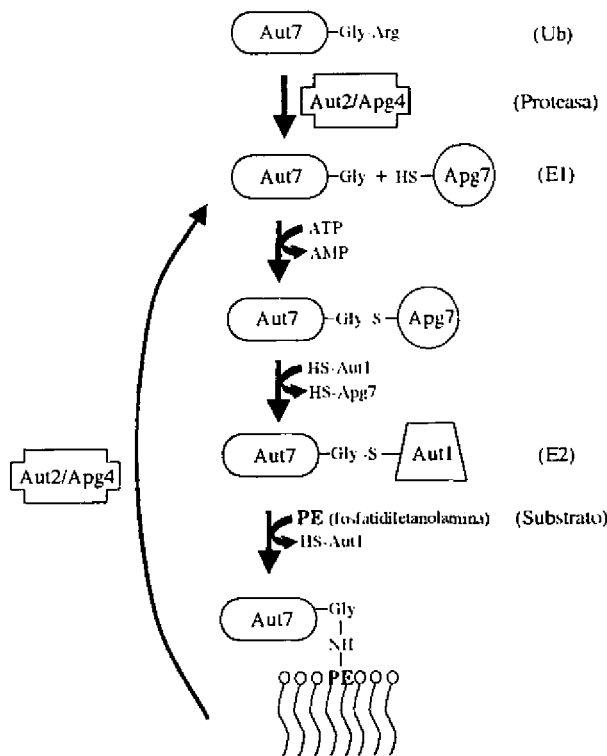


Fig. 12 Sistema de modificación de Aut7p. El segundo sistema de modificación de proteínas conocido implicado en la ruta de transporte de API es algo más complejo. En la figura se muestran en paréntesis, junto a las proteínas que participan en este sistema, el nombre alusivo a la función de estas proteínas. Para permitir la modificación de Aut7p es necesario primero su activación. Para ello es necesaria la proteasa Apg4p que elimina la arginina C-terminal y expone una glicina a la que se une Apg7p formando un enlace tioéster. Finalmente Aut7p es transferida a Aut1p que cataliza la unión a fosfatidiletanolamina en membrana mediante un enlace amida. Se pueden producir nuevas rondas de separación y unión a membrana de Aut7p debido a la ruptura del enlace amida por Apg4p y consiguiente unión, de nuevo a Apg7p. La unión a membrana de Aut7p, regulada también por la separación de esta gracias a Apg4p, es requerida para la eficiente formación de autofagosomas y vesículas cvt.

condiciones de ayuno de nitrógeno y que viaja a la vacuola en el interior de los autofagosomas, es necesaria para la biogénesis y total maduración de estas vesículas de transporte hasta alcanzar su tamaño final (Mizushima y col., 2001). En ausencia de Aut7p es posible la formación de un autofagosoma inmaduro insuficiente para que se produzca eficazmente la autofagia y el transporte de API. La mutación de este gen produce por tanto un fenotipo menos severo que el de otros genes Apg, ya que permite la formación de autofagosomas de menor tamaño (Abeliovich y col., 2000).

Respecto a la formación de las vesículas en condiciones vegetativas o de ayuno de fuente de nitrógeno, se pueden considerar dos posibilidades. La más sencilla sería que solo existiera un mecanismo de formación de vesículas: en condiciones de crecimiento se formarían vesículas pequeñas (vesículas cvt) que específicamente englobarían proteínas como API o α -manosidasa y, en ayuno, se formarían vesículas grandes por amplificación del proceso que englobarían, además de estas dos proteínas, porciones de citoplasma. La segunda posibilidad es que los dos procesos sean diferentes, a pesar de compartir elementos comunes. Las evidencias que existen hasta el momento parecen favorecer la segunda hipótesis. Hay proteínas que son necesarias sólo para uno de estos procesos. Este es el caso de Cvt3p, Cvt9p, Vac8p (Wang y col., 1998), Vps45p o Tlg2p (Abeliovich y col., 1999), necesarias sólo para el transporte por la ruta cvt. El caso de Vps45p y Tlg2p es muy significativo: ambas proteínas, homólogas de Sec1p y de syntaxina respectivamente, implicadas en fusión de vesículas, se necesitan para la formación de las vesículas cvt pero no de los autofagosomas (Abeliovich y col., 1999). Por otro lado, Sec12p, Sec16p, Sec23p y Sec24p, conocidas por participar en la formación de las vesículas que viajan desde el RE al aparato de Golgi, son necesarias para la formación de los autofagosomas pero no para la formación de las vesículas cvt (Ishihara y col., 2001). Estos hechos parecen indicar que el origen de las membranas o, al menos, el mecanismo de formación de ambos tipos de vesícula es diferente en ambas situaciones fisiológicas (crecimiento vegetativo y situación de ayuno).

Parece evidente que debe existir una regulación del mecanismo que lleva a la célula hacia la formación de uno u otro tipo de vesícula dependiendo de las condiciones fisiológicas. Algunos aspectos de esta señalización sí se conocen y la proteína quinasa Tor, perteneciente a la familia de las fosfatidil inositol quinasas, parece ser el elemento iniciador de la ruta, que percibe el ayuno y transmite una señal. Tor es necesaria para la regulación de los diferentes cambios adaptativos que sufre la célula cuando se somete a ayuno (Noda y Ohsumi, 1998; Jiang y Broach, 1999). Muchos de los procesos que dependen de la inactivación de Tor, que

ocurre cuando se somete a las células a ayuno de nutrientes, operan a través de un cambio en el estado de fosforilación de Tap42p, una proteína que actúa como subunidad catalítica de las proteínas fosfatasa PP2A y Sit4p (Di Como y col., 1996). La regulación de la autofagia (Fig. 13) es, sin embargo, dependiente de Tor pero no de Tap42p. Tor mantiene, probablemente de manera indirecta, a la proteína Apg13p en un estado hiperfosforilado. En situación de ayuno de nitrógeno Tor se inactiva y debido a ello Apg13p sufre una desfosforilación parcial que le permite interactuar de forma estable con la proteína quinasa Apg1p (Scott y col., 2000). En esta circunstancia la quinasa tiene mayor actividad que en condiciones de crecimiento (Kamada y col., 2000). La diferencia en el nivel de actividad fosforilante de Apg1p podría ser importante para que se formen las vesículas cvt o los autofagosomas. Además, la interacción de Apg1p con Apg17p y con Cvt9p, necesarias para autofagia y para ruta cvt respectivamente (Scott y col., 2000), y la asociación entre Apg13p y Vac8p (esta última necesaria para la ruta cvt) son determinantes para esta regulación (Stromhaug y Klionsky, 2001). Se ha propuesto que Apg17p puede intervenir en la asociación entre Apg13p y Apg1p (Kamada y col., 2000) y Vac8p puede influir en el estado de fosforilación de Apg13p. Cvt9p podría unir al complejo que forma Apg1p con alguna estructura de orden superior necesaria para los procesos iniciales requeridos para la inclusión de pAPI en vesículas cvt (Stromhaug y Klionsky, 2001).

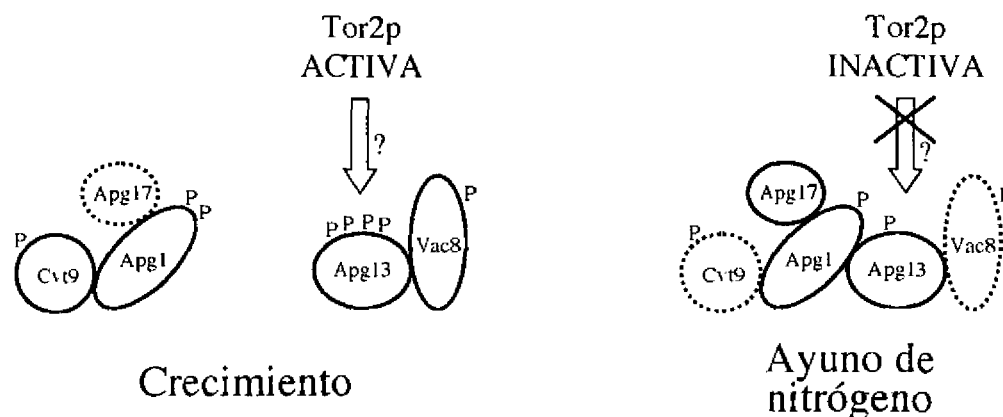


Fig. 13 Regulación de la función de Apg1p. Apg1p parece tener un papel central en la inducción de la autofagia e inhibición de la ruta cvt. Tor2p es una quinasa activa en presencia de fuente de nitrógeno e inactiva en ausencia. Directa o indirectamente actúa sobre el estado de fosforilación de Apg13p que en condiciones de ayuno se encuentra hipofosforilada. En esta situación es posible la formación de un complejo con Apg1p, lo cual a su vez aumenta su actividad proteína quinasa. El nivel de actividad quinasa y la actividad de otras proteínas que se asocian a Apg1p o a Apg13p y que son necesarias sólo en condiciones de crecimiento (Cvt9p y Vac8p) o de ayuno de nitrógeno (Apg17p) determina la formación de las vesículas cvt o de los autofagosomas.

A pesar del avance que se ha llevado a cabo en estos años en el conocimiento de la ruta de transporte de API a la vacuola aún quedan muchos puntos por clarificar. Entre los más interesantes podemos citar el estudio de los mecanismos moleculares de formación de las

vesículas en las que se transporta API, los factores de esta ruta que favorecen la especificidad del transporte de API, y los elementos que permiten la regulación del paso de la ruta cvt a la ruta autofágica.

Objetivos

Objetivos

- Búsqueda de proteínas capaces de interaccionar *in vitro* con la extensión amino terminal de la aminopeptidasa I.
- Búsqueda de proteínas capaces de interaccionar *in vivo* en el sistema de dos híbridos con distintas regiones de la aminopeptidasa I.
- Identificación y caracterización en su caso de las proteínas encontradas.
 - Estudio de la etapa del transporte en la que intervienen las proteínas
 - potencialmente detectadas.

Materiales y Métodos

Materiales y Métodos

1. Microorganismos utilizados en este trabajo

1.1 Cepas de *Escherichia coli*

Las cepas de *E. coli* que utilizamos para la propagación de plásmidos se detallan en la tabla 2. La cepa DH5- α fue utilizada para la obtención de plásmidos que iban a ser secuenciados.

Tabla 2. Cepas de *E. coli* utilizadas en este trabajo.

CEPA	GENOTIPO	REFERENCIA
DH5- α	<i>supE44 ΔlacU169(Φ80lacZΔM15) <i>hsdR17</i> <i>recA1 endA1 gyrA96 relA1</i>]</i>	Hanahan, 1983
TG1	<i>F'(traD36 proAB⁺ lac I^q lacZΔM15) supE</i> <i>hsdΔ5 thiΔ(lac-proAB)</i>	Sambrook y col., 1989

1.2 Cepas de *Saccharomyces cerevisiae*

Las cepas de *S. cerevisiae* utilizadas en este trabajo se detallan en la tabla 3. A continuación se describe brevemente la construcción de algunas de ellas:

- La cepa *Ala234* se construyó como sigue: la cepa silvestre W303-1B se transformó sucesivamente con los módulos de interrupción de los genes *SSA2*, *SSA3* y *SSA4*, portadores de los marcadores *LEU2*, *TRP1* y *KanMX4* respectivamente, seleccionando en cada caso por el marcador de interrupción. Los módulos de interrupción se obtuvieron amplificando mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a partir de DNA genómico de la cepa *a1-45* (Becker y col., 1996) portadora de dichas interrupciones, con los oligonucleótidos apropiados (ver apartado 3.6.1), con la excepción de *SSA4*, cuyo módulo de interrupción se obtuvo amplificando a partir del plásmido pFA6a-KanMX4 utilizando oligonucleótidos híbridos (ver apartado 3.6.3).

- La cepa $al^{1s}a234$ se construyó reemplazando, en la cepa A1a234, el gen *SSA1* por el alelo *al-45* que lleva una mutación puntual (Becker y col., 1996) que confiere termosensibilidad a la proteína Ssa1p. El reemplazamiento del alelo se realizó como se describe en el apartado 3.7.

Tabla 3. Cepas de *Saccharomyces cerevisiae* utilizadas en este trabajo.

CEPA	Nombre usado	GENOTIPO	REFERENCIA
W303-1B	Silvestre	<i>MATα ade2-1 his3-11/15 leu2,3-112 ura3-52 trp1-1 can1-100</i>	Thomas y Rothstein, 1989
al-45	al-45	<i>MATα his3-11,15 leu2-3,112 trp1-Δ1 lys2 ura3-52 ssa1^{1s} ssa2::LEU2 ssa3::TRP1 ssa4::LYS2</i>	Becker y col., 1996
ESY170	A1a234	<i>W303-1B; ssa2::LEU2 ssa3::TRP1 ssa4::KanMX4</i>	Silles y col. 2000
ESY216	$al^{1s}a234$	<i>W303-1B; ssa1^{1s} ssa2::LEU2 ssa3::TRP1 ssa4::KanMX4</i>	Silles y col. 2000
ESY228	$al^{1s}a234\Delta$ <i>ape1</i>	<i>W303-1B; ssa1^{1s} ssa2::LEU2 ssa3::TRP1 ssa4::KanMX4 ape1::HIS3</i>	Silles y col. 2000
BY4741	Silvestre	<i>MATα his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0</i>	EUROSCARF
ESY247	Δ <i>cvt19</i>	<i>BY4741; cvt19::KanMX4</i>	EUROSCARF
	Δ <i>apg12</i>	<i>BY4741; apg12::HIS3</i>	Leber y col., 2001
ESY351	Δ <i>pep4</i>	<i>BY4741; pep4::HIS3</i>	Leber y col., 2001
PJ69-4A	PJ69-4A	<i>MATα trp1-901 leu2-3,112 ura3-52 his3-200 LYS2::GAL1-HIS3 met2::GAL7-lacZ GAL2-ADE2 gal4Δ gal80Δ</i>	James y col., 1996

- La cepa $al^{1s}a234\Delta$ *ape1* se construyó reemplazando el gen *APE1* de la cepa $al^{1s}a234$, por el módulo de interrupción *APE1::HIS3* obtenido a partir del plásmido pGEM4-APE1::HIS3 (Seguí-Real y col., 1995) descrito en el apartado 3.6.2. El módulo de interrupción se transformó en la cepa $al^{1s}a234$ y se seleccionaron transformantes protótrofos para histidina (apartado 3.6.2).

- La cepa Δ *apg12* se construyó sustituyendo el gen *APG12* de la cepa silvestre BY4741 por un módulo de interrupción *APG12::HIS3* obtenido como se describe en el apartado 3.6.3, reemplazando el gen *APG12* de la cepa BY4741 por el módulo de interrupción *APG12::HIS3*, amplificado a partir del plásmido pFA6a-HIS3MX6 utilizando oligonucleótidos híbridos. El módulo de interrupción se transformó en la cepa BY4741 y se seleccionaron transformantes protótrofos para histidina (apartado 3.6.3).

- La cepa Δ *pep4* se construyó reemplazando el gen *PEP4* de la cepa BY4741 por el módulo de interrupción *PEP4::HIS3* obtenido a partir del plásmido PWO120 descrito en el apartado

3.6.2. El módulo de interrupción se transformó en la cepa BY4741 y se seleccionaron transformantes protótrofos para histidina (apartado 3.6.2).

2. Medios de cultivo, condiciones de crecimiento y mantenimiento de las cepas

2.1 *Escherichia coli*

- LB:

Bactotripton	2 %
Extracto de levadura	1 %
NaCl	1 %

Este medio se ajustó a pH 7,5 con NaOH 5 N y se esterilizó por calor durante 15 minutos.

- LBA: es el medio LB suplementado con 50 µg/ml de Ampicilina. Se utilizó para seleccionar los transformantes por resistencia a este antibiótico.

Para la preparación de medios sólidos se añadió agar a una concentración final de 2% (USBiological). Estas placas de LBA se suplementaron, en algunos casos, con X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosido) (0,004%) e IPTG (isopropil-β-D-tiogalactósido) (0,2 mM) para disponer de un criterio de selección de plásmidos recombinantes por la pérdida de actividad β-galactosidasa.

Las bacterias se cultivaron incubándolas a 37 °C durante la noche, con agitación en el caso de los cultivos líquidos.

2.2 *Saccharomyces cerevisiae*

- YPD:

Extracto de levadura	2 %
Peptona	1 %
Glucosa	2 %

- YPD + Geneticina: medio YPD suplementado con geneticina (G418) a una concentración de 200 µg/ml. Este medio se utilizó para seleccionar las cepas con genes interrumpidos con el módulo *KanMX4* que en levadura confiere resistencia a G418.

- SD (medio mínimo sintético):

Yeast Nitrogen Base (YNB) (USBiological)	6,7 g/l
Glucosa	2 %

Este medio se ajustaba a pH 5,5 con NaOH.

El medio mínimo sintético se suplementó según las auxotrofías de cada cepa y teniendo en cuenta la selección que se quisiera realizar (marcador de plásmido o marcador de módulo de interrupción). La adenina, el uracilo y los aminoácidos se añadieron a una concentración de 0,1 mg/ml. En algunas ocasiones que se indican en la Memoria, en experimentos con genes expresados a partir del promotor de *GALI*, se sustituyó la glucosa por galactosa o rafinosa (al 2%) como fuente de carbono. Para desreprimir el promotor *MET25* en los plásmidos derivados de pGFP-N-FUS y pGFP-C-FUS en la cepa BY4741 (auxótrofa para metionina) se cultivaron las células con una concentración de 10 µg/ml de metionina.

- SD(-N) (medio de ayuno de nitrógeno):

YNB sin aminoácidos ni sulfato amónico	1,7 g/l
Glucosa	2%

Para la preparación del medio de ayuno se utilizó agua bidestilada.

Todos los medios de crecimiento de levadura se esterilizaron en autoclave salvo el YNB y el triptófano que se esterilizaron por filtración.

Las levaduras se cultivaron incubándolas a 30° C, salvo en los mutantes termosensibles (24° o 37° C), con agitación en el caso de cultivos líquidos, durante una o más noches.

2.3 Mantenimiento de las cepas

Para mantener todas las cepas de *E. coli* y *S. cerevisiae* utilizadas en este trabajo, se cultivaron las células en placas con sus respectivos medios de cultivo, se recogieron con el asa de siembra, se resuspendieron en un vial con glicerol estéril al 15 % y se almacenaron a -70 °C. Para utilizar las células a partir de los viales se recogía una alícuota de la solución congelada raspando estos con un asa de siembra y se inoculaba una placa con medio de cultivo en agar.

3. Manipulación de ácidos nucleicos

3.1 Vectores

Para la construcción de los plásmidos utilizados en el desarrollo de esta Memoria se han utilizado los siguientes vectores:

pUC18: Este vector, que expresa el gen *LacZ'* cuando no se introduce un fragmento de DNA en el sitio de clonación múltiple, se utilizó para la selección por color para identificar los

clones positivos. Contiene el origen de replicación del bacteriofago M13 y el gen *Amp^r* que confiere resistencia a ampicilina (Fig. 14).

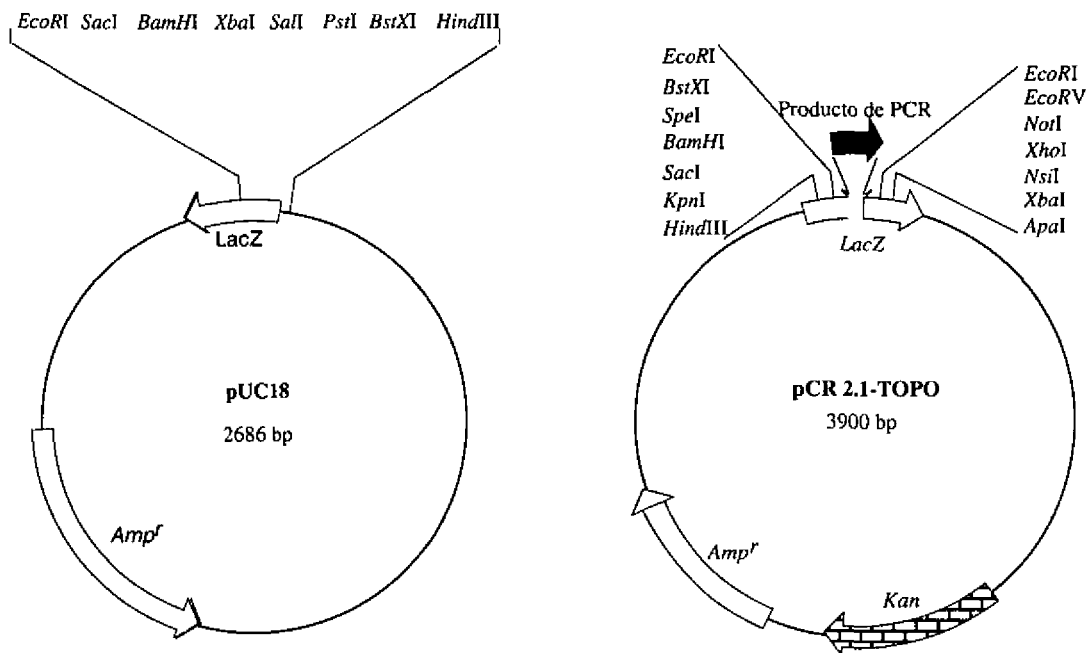


Fig. 14. Vectores pUC18 y pCR®2.1-TOPO®

pCR®2.1-TOPO®: Vector en el se pueden clonar productos de PCR sin necesidad de utilizar enzimas de restricción ni ligasa. Confiere resistencia a ampicilina en *E. coli* (Fig. 14).

pRS306: Plásmido integrativo con el marcador de selección *URA3* de *Saccharomyces*

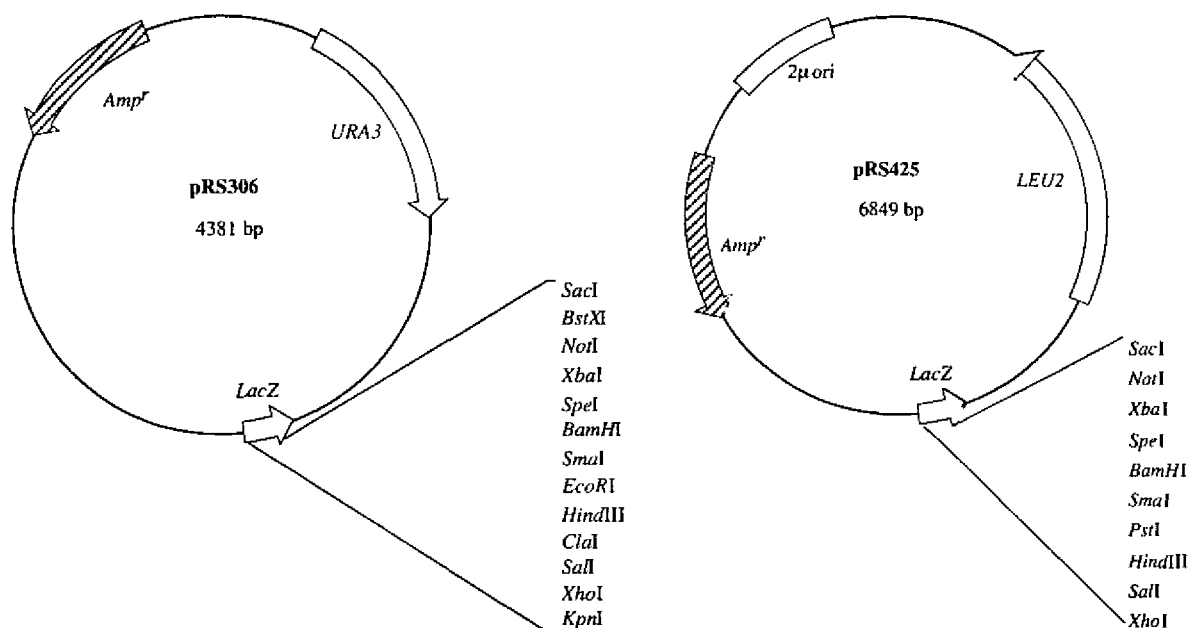


Fig. 15. Vectores pRS306 y pRS425

cerevisiae. Puede replicarse en bacterias y presenta el gen de resistencia a ampicilina, lo que permite su selección en *E. coli* (Fig. 15).

pRS425: Vector lanzadera multicopia con el marcador de selección *LEU2* para levadura y el gen de resistencia a ampicilina para *E. coli* (fig. 15).

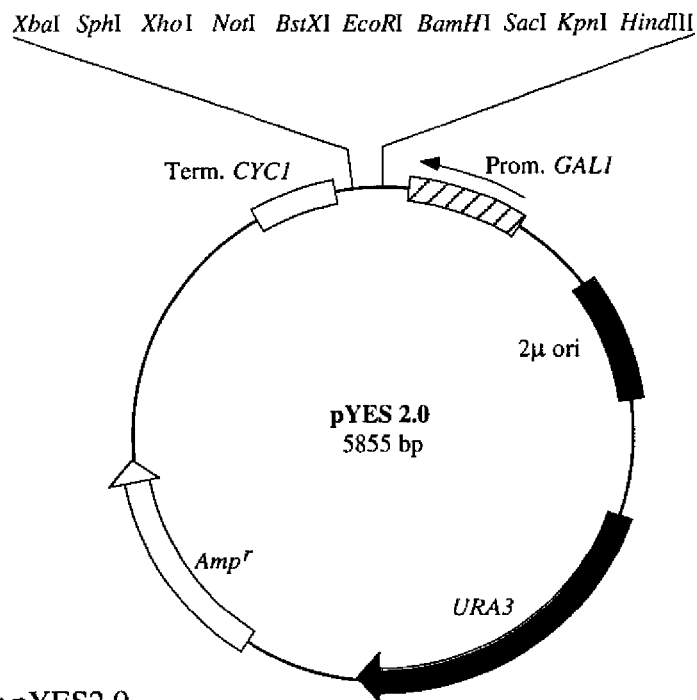


Fig.16 Vector pYES2.0

pYES 2.0: Vector lanzadera multicopia con el gen *URA3* de *S. cerevisiae* como marcador de selección en levadura y resistencia a ampicilina en bacterias. Contiene el promotor del gen *GALI* (Fig. 16).

pGFP-N-FUS: Vector lanzadera centromérico (Niedenthal y col., 1996) que permite la fusión de genes a la secuencia codificante de la proteína verde fluorescente (GFP) de *Aequorea victoria*. La fusión resulta en una proteína quimérica con GFP en el extremo amino terminal controlada por el promotor del gen *MET25*, reprimible con metionina (Mumberg y col., 1994). El marcador de selección en levadura es *URA3* mientras que en *E. coli* se selecciona por resistencia a ampicilina (Fig. 17).

pGFP-C-FUS: Este vector tiene los mismos componentes que pGFP-N-FUS (Fig. 17). La diferencia con este último vector consiste en que se produce una proteína de fusión con GFP en el extremo carboxilo terminal (Niedenthal y col., 1996).

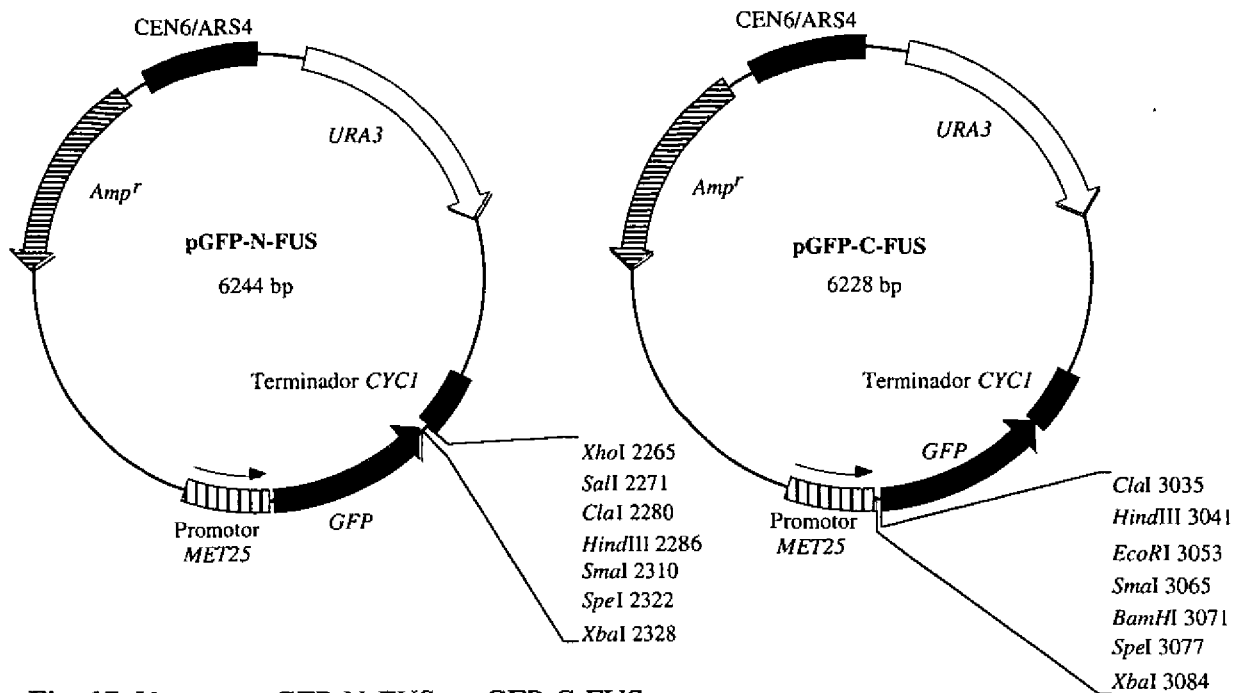


Fig. 17. Vectores pGFP-N-FUS y pGFP-C-FUS

pGBT9: Plásmido diseñado para estudiar interacción entre proteínas en el sistema de dos híbridos (Clontech). Sirve para producir fusiones en fase de lectura entre la secuencia codificante del dominio de unión a DNA del factor de transcripción Gal4p (situado en N-terminal) y un gen de interés. Es un plásmido lanzadera, con el gen de resistencia a ampicilina para su selección en bacterias. Se propaga en levadura gracias a la región del círculo de dos

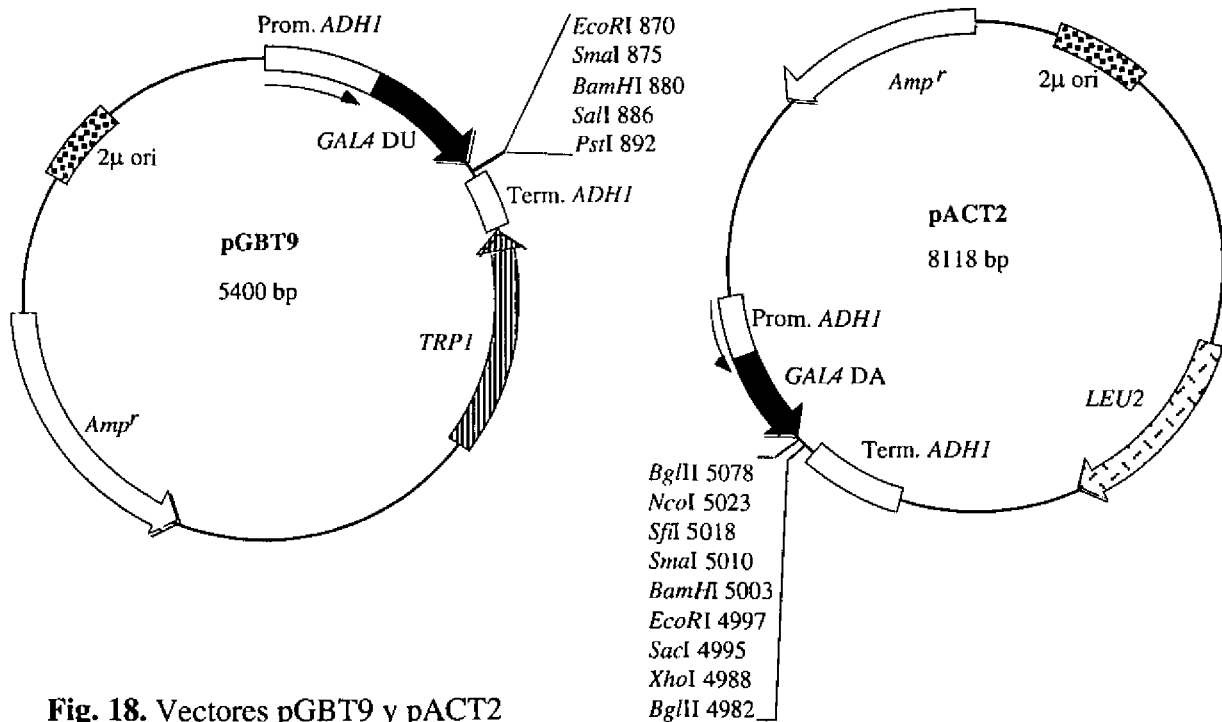


Fig. 18. Vectores pGBT9 y pACT2

micras y el marcador de selección es *TRP1* (Fig. 18).

pACT2: Plásmido diseñado para estudiar interacción entre proteínas en el sistema de dos híbridos. Sirve para producir fusiones en fase de lectura entre la secuencia codificante del dominio de activación de la transcripción del factor de transcripción Gal4p (situado en N-terminal), y el gen de interés en el sistema de dos híbridos (Clontech). Es un plásmido multicopia y el marcador de selección es *LEU2* (Fig. 18).

3.2 Construcción de plásmidos

A continuación se muestra cómo se llevó a cabo la construcción de los plásmidos utilizados en esta Memoria: Los oligonucleótidos que se utilizaron para llevar a cabo estas construcciones y las interrupciones génicas que se describen en el apartado 3.6 se muestran en la tabla 4.

3.2.1 Construcciones en pUC18

- Plásmido pES11: contiene el fragmento *KpnI-SphI* de 1,7 kb de *SSA1*, obtenido mediante la amplificación de DNA genómico de la cepa W303-1B, con los oligonucleótidos oES19 y oES20, en este vector.
- Plásmido pES12: obtenido por eliminación del fragmento *KpnI-SalI* de pES11, contenido en el fragmento *KpnI-SphI*, para intercambiarlo por el mismo fragmento de 1 kb obtenido amplificando el alelo termosensible de *SSA1*, presente en la cepa al-45, con los oligonucleótidos oES19 y oES22.
- Plásmido pES20: contiene el fragmento *SalI-PstI* de 1,35 kb obtenido de pES42 (ver apartado 3.2.4). El fragmento se amplificó con los oligonucleótidos oES43 y T3. El sitio *SalI* del inserto se introdujo por mutagénesis con el oligonucleótido oES43.

3.2.2 Construcciones en pCR®2.1-TOPO®

- pES41: la zona codificante de *CVT19* (1,2 kb) se clonó en el vector pCR®2.1-TOPO® flanqueado por las secuencias 5'-GGAATTCCAGCTGACCACC-3', antes del sitio de inicio de la traducción, y 5'-CATGGCAATTCCCGGGGATC-3', después de la zona codificante (estas regiones se representan aquí en la misma cadena, Fig. 19). Estas regiones se introdujeron amplificando la zona codificante con oligonucleótidos híbridos que incluían en sus respectivas regiones 5' las secuencias indicadas anteriormente, las cuales contienen varias

dianas para enzimas de restricción, y en las regiones 3' 25 pares de bases aproximadamente de zona codificante 5' y 3' respectivamente. La zona codificante de *CVT19* y los oligonucleótidos híbridos se obtuvieron de Research Genetics.

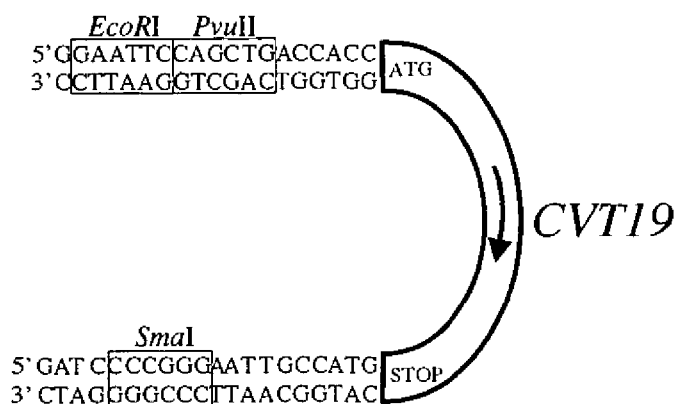


Fig. 19. Región codificante de *CVT19* flanqueada por secuencias que incluyen sitios de restricción.

3.2.3 Construcciones en pRS306

- Plásmido pES13: contiene el fragmento *KpnI-HindIII* de 1,7 pb de pES12 (que abarca la región entre *KpnI* y *SphI* del alelo termosensible de *SSA1*) en este vector.

3.2.4 Construcciones en pRS425

- pES42: contiene el fragmento *ApaI-HindIII* de pEMBLyex4-APE1 (Seguí-Real y col., 1995) de 2,5 kb, que incluye la zona codificante de *APE1* bajo el control del promotor de *GALI* en el vector pRS425. El plásmido pEMBLyex4-APE1 (cedido por el Dr. I. V. Sandoval) había sido construido amplificando el gen para crear los sitios de restricción *Sall* (en 5') y *HindIII* (en 3') e introduciéndolo, utilizando estas dianas, en el vector multicopia pEMBLyex4.

3.2.5 Construcciones en pYES 2.0

- pYES-CVT19: fragmento *EcoRI-SmaI* de 1,2 kb de pES41, clonado en el vector pYES2.0 digerido con *EcoRI-XhoI* después de producir extremos romos en el sitio cortado con *XhoI*.

3.2.6 Construcciones en pGFP-N-FUS

- pGFP-CVT19: la región codificante de *CVT19* se amplificó a partir de pES41 originando un sitio de restricción *XhoI* y un codón de parada de la traducción en el extremo 3'. Este cambio se introdujo con el oligonucleótido oES44, cuya pareja en la reacción de la polimerasa en

cadena fue el oligonucleótido M13 (R). Este fragmento de DNA de 1,25 kb se digirió con *PvuII* (presente en la región 5' de pES41) y *XhoI* y se introdujo en el vector digerido con *SmaI* y *XhoI*.

3.2.7 Construcciones en pGFP-C-FUS

- pCVT19 Δ C32-GFP: el fragmento *EcoRI-ClaI* de 1,1 kb de pES41 fue introducido entre los sitios *EcoRI* y *ClaI* del sitio de clonación de pGFP-C-FUS.
- pCVT19 Δ C32: este plásmido se obtuvo después de digerir pCVT19 Δ C32-GFP con *Sall* y religar para eliminar el fragmento *Sall-Sall* que contenía la secuencia codificante de GFP.

3.2.8 Construcciones en pGBT9

- pGBT9-prepro: región de *APE1* amplificada con los oligonucleótidos oES117 y oES151 a partir de pEMBLyex4-APE1 (Seguí-Real y col., 1995) e introducida en pGBT9 como *SmaI-BamHI*. El fragmento amplificado codifica la secuencia de API correspondiente a los aminoácidos 1 a 44.
- pGBT9-N-API: región del gen *APE1* amplificada con oligos oES117 y oES152 e introducida en pGBT9 como *SmaI-BamHI*. El fragmento amplificado codifica la secuencia de API correspondiente a los aminoácidos 1 a 257.
- pGBT9-API Δ 10: región de *APE1* que codifica toda la proteína API a excepción de los últimos 10 aminoácidos, amplificada con oligos oES117 y oES153 e introducida en pGBT9 como *SmaI-Sall*.
- pGBT9-API Δ 100: contiene el fragmento *SmaI-BamHI* de *APE1* obtenido por digestión de pGBT9-API (ver más abajo). Incluye la secuencia correspondiente a los aminoácidos 1 a 416 de API.
- pGBT9-mAPI: introducción del fragmento *Sall-PstI* de pES20 en el vector pGBT9. La construcción incluye la secuencia correspondiente a los aminoácidos 54 a 515 de API.
- pGBT9-API: intercambio del fragmento *PstI-PstI* de pGBT9-API Δ 10 con pES42. Esta construcción incluye toda la zona codificante de *APE1*.

Tabla 4. Oligonucleótidos utilizados en esta Memoria para amplificar fragmentos de DNA. En letras minúsculas y negrita se indican los cambios de secuencia en los oligonucleótidos respecto a la cadena molde. En los oligonucleótidos híbridos oES27, oES28, oES48 y oES49 se muestra con una barra la separación entre la región que hibrida con la zona flanqueante al gen que se quiere interrumpir (zona 5' del oligonucleótido) y la región que hibrida con el plásmido pFA6a-KanMX4 o pFA6a-HIS3MX6 (zona 3' oligonucleótido). En la columna de la derecha se muestra la secuencia con la que hibridan los oligonucleótidos en las amplificaciones. La indicación 5' o 3' se refiere a aquellos oligonucleótidos que hibridan fuera de la secuencia codificante.

NOMBRE	SECUENCIA	GEN
oES13	CACTATGGGAAGGTGTGGACG	SSA2 5'
oES14	GGGAAAATGACCGATATTC	SSA2 3'
oES15	GGCGGTCTCTATTACCAAAGGC	SSA3 5'
oES16	GGTGGCAAATGGAGGCCCATCG	SSA3 3'
oES19	CTTCCCATCATAAACACGGACC	SSA1 5'
oES20	GATTCTCGCCTTTGGGCGAC	SSA1 3'
oES22	GCTTGTCCAATTTGTCACC	SSA1
oES27	GAATGTAATAGGTTTCAAAGCGGATATCTTTTGCCCCGGTGAG/ CGTACGCTGCAGGTGCACG	SSA4 5'/ KanMX4
oES28	GCGAAATCGCATCCCGGTTGAGGCACTTAATTAACTCTGGC/ ATCGATGAATTCGAGCTCGTT	KanMX4/ SSA4 3'
oES42	CTGACCACCATGgACAACCTCAAAG	CVT19
oES43	TATGAGGATAgTcgACAG GAATTC	APE1
oES44	ATTGCCATGCTcGAGTTaTTCCCA	pES41
oES48	CTATAGGTTGAGTGTCTATCAAAAATTTACGGAGACGCGATG/ CGTACGCTGCAGGTGCACG	APG12 5'/ HIS5
oES49	GGGAGTGCTCATGATGCTTGATTCATCAGGGGAAGAAAGCGC/ ATCGATGAATTCGAGCTCGTT	HIS5/ APG12 3'
oES53	CAATTGGCGATGGCCCTGTC	GFP
oES55	CTGGTAACGTcTCGAgTTaAAAGGAGT	CVT19
oES117	GGTACCcGGGAaCCTCTAGAGcC	pEMBLyex4
oES151	GTGCTCGAGGATcCACCACG	APE1
oES152	CTTAACAGGTGGATcCAGTGTTTG	APE1
oES153	CGAATTCATCGTcGACTGATCTCC	APE1
T3	AATTAACCCTCACTAAAGGG	pRS425
M13 (R)	CAGGAAACAGCTATGAC	pUC18
M13 (D)	GTAAAACGACGGCCAGT	pUC18

3.2.9 Construcciones en pACT2

- pACT2-CVT19: contiene el fragmento *NcoI-SmaI* originado amplificando desde pES41, utilizando los oligonucleótidos oES42 (que crea sitio de restricción *NcoI*) y M13 (D).
- pACT2-CVT19ΔC32: contiene el fragmento *NcoI-XhoI* originado a partir de la amplificación de pES41, utilizando el oligonucleótido oES42 (que crea sitio de restricción *NcoI*) y oES55 (que origina el sitio *XhoI*).

3.3 Preparación de ácidos nucleicos

3.3.1 Obtención de DNA plasmídico de *E.coli*

Para la secuenciación automática los plásmidos se obtuvieron utilizando el sistema suministrado por Roche Molecular Biochemicals, llamado High Pure Plasmid Isolation Kit, siguiendo las indicaciones de la casa comercial. Para obtener pequeñas cantidades de DNA plasmídico que no requerían excesiva pureza (análisis de restricción) seguimos el protocolo de Holmes y Quigley (1981). La cuantificación de estos DNA se hizo habitualmente en geles de agarosa al 0.7 % después de linearizar el plásmido, comparando con patrones de concentración conocida.

3.3.2 Extracción de plásmido de levadura

Para obtener plásmido de levadura (Glover, 1985), las células se recogieron en fase estacionaria, se resuspendieron en una solución conteniendo EDTA 0.1 M (pH 7,5), sorbitol 0.9 M y β -mercaptoetanol 28 mM y se lisaron con Zimoliasa 20T. Una vez obtenido el DNA plasmídico se precipitó con etanol y se transformó en *E. coli* para su amplificación.

3.3.3 Extracción de DNA genómico de levadura

Para la obtención del DNA genómico se partió de un cultivo de 10 ml en YPD (Glover, 1985). Las células se trataron con sorbitol 0.9 M, EDTA 0.1 M, β -Mercaptoetanol 15 mM y con 75 μ g de Zimoliasa 20T durante una hora a 37 °C para digerir la pared. Los esferoplastos se lavaron, sedimentaron y resuspendieron en Tris-HCl 50 mM pH7, EDTA 20 mM y 0,5 % SDS. El sobrenadante se trató con acetato potásico 5 M en hielo durante 60 minutos. Posteriormente se incubó con RNasa A, y el DNA se precipitó con isopropanol y se resuspendió en H₂O.

3.4 Técnicas de modificación de DNA

3.4.1 Digestión del DNA

El DNA se digirió con endonucleasas de restricción siguiendo las recomendaciones de la casa comercial en cuanto al tampón y la temperatura más adecuados para la digestión, utilizando entre 2 y 5 U/ μ g DNA durante un mínimo de 1 hora.

3.4.2 Defosforilación del DNA

La defosforilación del DNA elimina el fosfato 5' en aquellos vectores que han sido digeridos con endonucleasas de restricción. De esta forma se evita el religamiento del vector. Para ello, el DNA se trató con fosfatasa alcalina de intestino de ternera. Se utilizaron 0.5 U (Roche Molecular Biochemicals) para tratar 0.2 pmoles de DNA en un volumen final de 50 μ l. Se incubó a 37 °C durante 15 minutos, se paró la reacción añadiendo 4 μ l EDTA 0,5 M, 10 μ l SDS 10 % y 136 μ l H₂O y la enzima se inactivó por calor a 65 °C durante 30 minutos.

3.4.3 Ligamiento de fragmentos de DNA

Para la ligación de fragmentos de DNA se utilizó el enzima T4 DNA ligasa (Roche Molecular Biochemicals). Se siguieron las indicaciones de la casa comercial en cuanto al tampón utilizado. En todos los casos el volumen en el que se realizó la ligación fue de 10 μ l y se utilizó 1 U de enzima. La mezcla de ligación se dejó a temperatura ambiente durante un mínimo de 6 horas. En algunos casos se utilizó el sistema de ligamiento rápido de Roche Molecular Biochemicals siguiendo las instrucciones de esta casa comercial.

3.4.4 Generación de extremos romos

Para la generación de extremos romos de DNA partiendo de extremos 5' protuberantes, se utilizó el enzima *Klenow* (Roche Molecular Biochemicals). En la mezcla de reacción se añadieron dNTPs (0.2 mM) y el tampón recomendado por la casa comercial. La reacción se llevó a cabo en un volumen final de 10 μ l. Se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente y posteriormente se inactivó la enzima por calor.

3.5 Métodos de transformación celular

3.5.1 Transformación de *E.coli*

Las células competentes de *E. coli* (cepas TG1 y DH5- α) se prepararon por el método descrito por Hanahan (1983). La transformación se llevó a cabo por el método del choque térmico (Sambrook y col., 1989). Las células transformantes se seleccionaron en placas de LBA.

3.5.2 Transformación de levadura

Para la transformación de células de levadura, se utilizó el método del acetato de litio (Ito y col., 1983). Para la interrupción génica utilizando el marcador de resistencia a

geneticina, las células una vez transformadas por el método anteriormente mencionado, se cultivaron durante 4 horas en YPD antes de extenderlas en placa de YPD con G418 (200 ng/ml), permitiendo así que el gen de resistencia a geneticina se expresase.

3.6 Interrupciones génicas

Las interrupciones génicas se realizaron en un único paso con un fragmento lineal de DNA conteniendo secuencias del gen a interrumpir flanqueando un marcador de selección. La transformación de dicho fragmento en la cepa receptora conduce a su integración en el locus homólogo (Rothstein, 1983). Se emplearon tres estrategias diferentes para la obtención de los módulos de interrupción génica: amplificación del módulo de interrupción desde DNA genómico utilizando como molde DNA de una cepa portadora de la interrupción (apartado 3.6.1), aislamiento del módulo de interrupción a partir de un plásmido en el que se había construido por métodos convencionales (apartado 3.6.2) y estrategia de los oligonucleótidos híbridos (apartado 3.6.3).

3.6.1 Amplificación de módulo de interrupción desde DNA genómico

Los módulos de interrupción génica de los genes *SSA2* (*SSA2::LEU2*) y *SSA3* (*SSA3::TRP1*) se obtuvieron mediante amplificación a partir de DNA genómico obtenido de la cepa termosensible a1-45 (Becker y col., 1996), portadora de dichas interrupciones. Para obtener estos módulos se emplearon oligonucleótidos alejados entre 0,2 y 0,4 kb aproximadamente del sitio de inicio de traducción (oES13 y oES15 para *SSA2* y *SSA3*, respectivamente) o del final de la misma (oES14 y oES14 para *SSA2* y *SSA3*, respectivamente), favoreciendo así la recombinación homóloga del fragmento amplificado en su locus correspondiente. La comprobación de las interrupciones se llevó a cabo mediante la verificación de los tamaños de los fragmentos amplificados de DNA genómico, obtenido de los transformantes presuntamente portadores de la interrupción génica.

3.6.2 Aislamiento del módulo de interrupción

El módulo de interrupción génica de los genes *APE1* y *PEP4* se obtuvo mediante la digestión, de los vectores pGEM4-*APE1::HIS3* (cedido por el Dr. I. V. Sandoval) y PWO120 (cedido por el Dr. D. H. Wolf). En el plásmido para la interrupción de *APE1*, pGEM4-*APE1::HIS3*, la región de *APE1* entre los sitios de restricción *XhoI-BamHI* se substituyó por el gen *HIS3* (Seguí-Real y col., 1995). En el plásmido PWO120 la región entre los sitios de restricción

EcoRI y *NcoI* de *PEP4* se substituyó por el gen *HIS3*. La comprobación de las interrupciones se llevó a cabo mediante la verificación de los tamaños de los fragmentos amplificados de DNA genómico obtenido de los transformantes que presuntamente habían incorporado el módulo de interrupción.

3.6.3 Estrategia de los oligonucleótidos híbridos

Esta estrategia se utilizó para la interrupción de los genes *SSA4* y *APG12*. El módulo de interrupción se obtuvo mediante PCR utilizando como DNA molde el vector pFA6a-KanMX4 (para interrumpir *SSA4*) o pFA6a-HIS3MX6 (para interrumpir *APG12*). El primer plásmido contiene el gen que confiere resistencia a kanamicina, en bacterias, o a geneticina (G418), en levaduras (Wach y col., 1994). El segundo contiene el gen *HIS5* de *Schizosaccharomyces pombe*, homólogo al gen *HIS3* de *Saccharomyces cerevisiae* y capaz de complementar la mutación de este último (Wach y col., 1997).

Para la obtención del fragmento de DNA utilizado en la interrupción génica se diseñaron oligonucleótidos híbridos de 60-65 pb, de modo que 20 pb en el extremo 3' hibridaran con las regiones flanqueantes del gen marcador contenido en el vector, y el resto, con las regiones flanqueantes del gen a interrumpir. El fragmento lineal amplificado de esta manera tiene por tanto, en sus extremos, 40-45 pb para permitir su recombinación homóloga en el locus genómico que se quiere reemplazar. Concretamente, para el módulo de interrupción de *SSA4*, se utilizaron los oligonucleótidos oES27 y oES28. La interrupción de *APG12* se llevó a cabo con el módulo de interrupción obtenido después de amplificar el gen *HIS5* de *S. pombe*, utilizando los oligonucleótidos oES48 y oES49. Los fragmentos obtenidos, de aproximadamente 1,5 kb o 1,25 kb, se transformaron en las cepas adecuadas y se llevó a cabo la comprobación de las interrupciones mediante la verificación de los tamaños de amplificación de DNA genómico obtenido de los posibles interrumpidos.

3.7 Reemplazamiento de alelo

El reemplazamiento de un gen silvestre por el alelo mutante se llevó a cabo en dos etapas mediante la transformación con un plásmido integrativo en el que se había clonado el gen de interés (Scherer y Davis, 1979). En la primera etapa la integración del plásmido dirige al locus deseado introduciendo un corte en un sitio interno del gen y se selecciona por el marcador *URA3* del plásmido. La integración resulta en repeticiones directas del gen, una

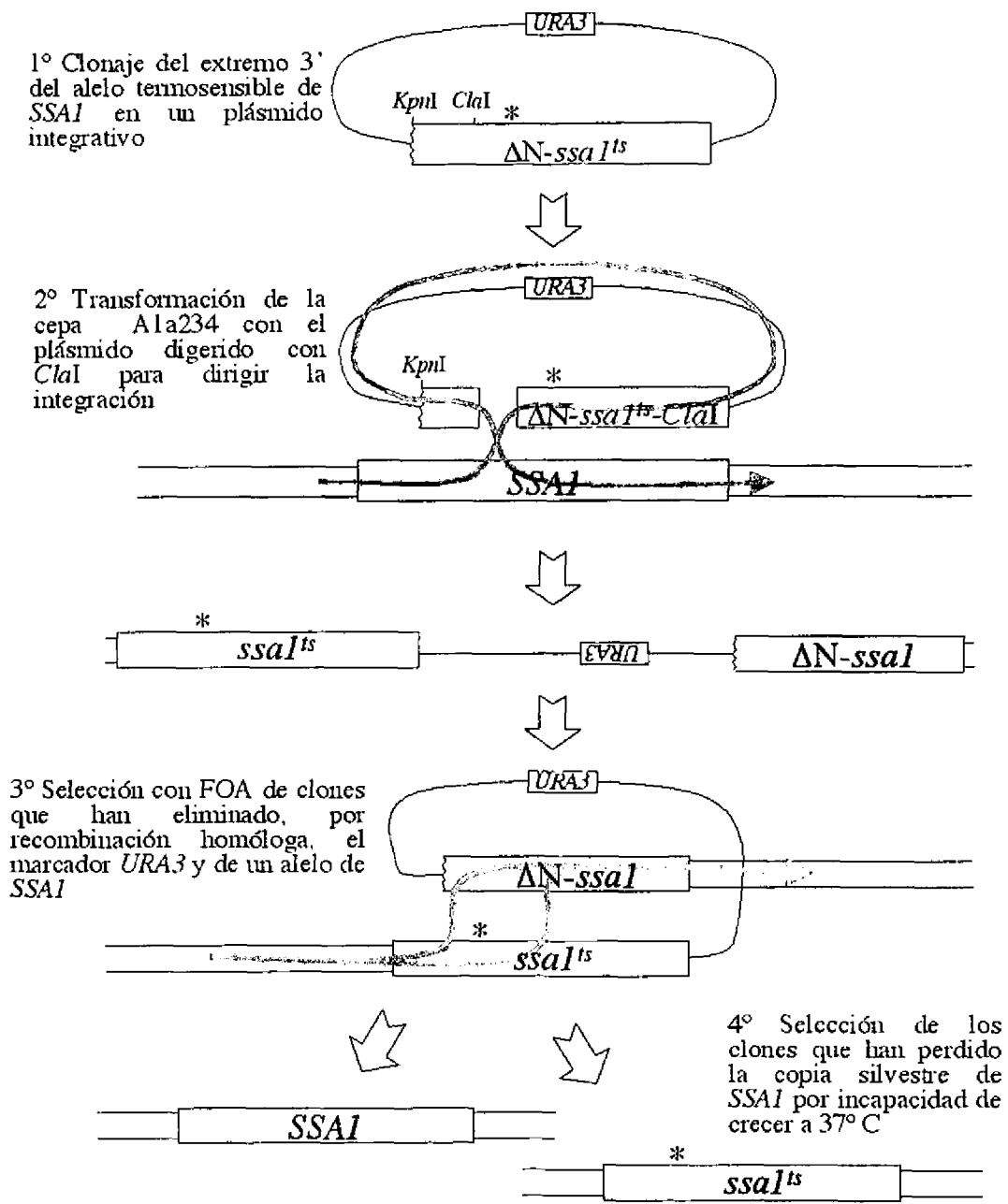


Fig. 20 Reemplazamiento del alelo silvestre de *SSA1* por el alelo termosensible de la cepa a1-45. En esta figura se representan los pasos que se llevaron a cabo para substituir el alelo silvestre de *SSA1* por el alelo termosensible en la cepa A1a234. En gris se representan las zonas correspondientes al alelo genómico del gen. Las flechas grises representan la dirección en la que se producen las recombinaciones. La mutación P417L se representa con un asterisco.

copia silvestre y otra mutante. Posteriormente se selecciona la escisión y pérdida del plásmido en medio conteniendo ácido fluorótico (FOA) al 0,1 %.

Este procedimiento se empleó para reemplazar el gen silvestre de *SSA1* en la cepa A1a234 por el alelo termosensible de la cepa a1-45 (Fig. 20). Esta última cepa fue utilizada para obtener por PCR el alelo a1-45 del gen *SSA1*. Se construyó un plásmido integrativo (pES13), con el marcador de selección *URA3*, que llevaba la región del extremo 3' del alelo termosensible (desde sitio *KpnI*) y se transformó en la cepa A1a234 después de digerir el DNA con *ClaI*, que cortaba a 0,4 kb de la mutación en *SSA1*. De esta manera se produjo una cepa que portaba el tandem formado por el alelo termosensible, el marcador *URA3* y el alelo truncado de *SSA1*. La pérdida del plásmido por recombinación de las secuencias homólogas se seleccionó en presencia de FOA. Aquellos clones que eliminaron el plásmido integrativo pero mantuvieron la mutación puntual (P417L) que confiere termosensibilidad, fueron seleccionados gracias a su incapacidad de crecer a 37°C (Becker y col., 1996). La introducción de las mutaciones fue confirmada mediante secuenciación.

3.8 Electroforesis de DNA en geles de agarosa

La separación de fragmentos de DNA se realizó mediante electroforesis en geles de agarosa horizontales, sumergidos en tampón TBE (Tris-borato 45 mM, EDTA 1 mM pH8) con bromuro de etidio a una concentración de 0,5 µg/ml, según el protocolo descrito por Sambrook y col. (1989). La concentración de agarosa utilizada fue del 0,7 %, salvo en los casos en que los fragmentos de DNA tenían un tamaño inferior a 0,5 kb, en los que se emplearon geles con agarosa al 1,5 %.

3.9 Amplificación de fragmentos de DNA por reacción en cadena de la polimerasa

Para amplificar fragmentos de DNA se utilizó una mezcla de reacción que incluía el DNA molde, una pareja de oligonucleótidos (20 pmoles), 1,75 U de DNA polimerasa con sistema de corrección (*Taq* DNA polimerasa y *Pwo* DNA polimerasa, ambas incluidas en el sistema High Fidelity, Roche Molecular Biochemicals), con el tampón suministrado por la casa comercial, y desoxinucleótidos (dATP, dTTP, dCTP y dGTP) a una concentración de 0,2 mM cada uno en un volumen final de 40 µl. La mezcla, en tubos MicroAmp (Perkin Elmer), se puso en un termociclador de la casa comercial Perkin Elmer (Gene Amp PCR System 2400). El programa estándar que se utilizó se detalla a continuación:

<u>Número de ciclos</u>	<u>Temperatura</u>	<u>Tiempo</u>	<u>Función</u>
1	94° C	3'	Desnaturalización
25	94° C	45"	Desnaturalización
	T _m -2° C*	45"	Anillamiento de oligonucleótidos
	72° C	1'/kb	Elongación
1	72° C	7'	Terminación de las cadenas

*La temperatura de anillamiento era habitualmente dos grados inferior a la T_m más baja de los dos oligonucleótidos (considerando T_m = (n° G x 4) + (n° C x 4) + (n° A x 2) + (n° T x 2)).

4. Técnicas bioquímicas

4.1 Obtención de extractos totales

Las células se recogieron por centrifugación a 18.000 x g y se lavaron con agua fría. Las células se suspendieron en 150 µl EDTA 5 mM, Tris HCl 50 mM pH8 en presencia de una mezcla de inhibidores de proteasas (aprotinina 1 µg/ml, leupeptina 1 µg/ml, pepstatina 1 µg/ml y PMSF1 mM) y se rompieron con bolas de vidrio en 10 ciclos de 30" mediante agitación en el vortex, enfriando entre ciclos en hielo. La suspensión se centrifugó a 500 x g para descartar en el sedimento células sin romper, paredes y núcleos celulares. Se valoró la concentración de proteínas de este sobrenadante y se utilizó como extracto crudo.

4.2 Analisis de proteínas

4.2.1 Determinación de la concentración de proteínas

La concentración de proteínas se estimó mediante el método de Bradford (Bradford, 1976), utilizando el reactivo de Bio-Rad (Bio-Rad Protein Assay). La proteína IgG bovina se empleó como patrón de concentración.

4.2.2 Electroforesis de proteínas en gel de poliacrilamida

La separación de proteínas en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes se llevó a cabo según el método de Laemmli (1970).

4.2.3 Inmunodetección de proteínas

Las proteínas separadas por electroforesis se transfirieron a membranas de PVDF según se describe en Sambrook y col., 1989. La transferencia se comprobó mediante la tinción reversible de las proteínas con el colorante Ponceau S (Aebersold y col., 1987). Las membranas se bloquearon con leche liofilizada al 3% y la inmunodetección se llevó a cabo con un anticuerpo policlonal de conejo anti-API o anti-CPY y un anticuerpo secundario

acoplado a peroxidasa. Para revelar las membranas se utilizó el sistema de ECL y autoradiografía.

El anticuerpo contra API (cedido por el Dr. I. V. Sandoval) se produjo contra una fusión a β -galactosidasa de la zona de API comprendida entre los sitios de restricción *XhoI* y *BamHI* del gen *APE1* (Seguí-Real y col., 1995). El anticuerpo contra CPY fue cedido por el Dr. R. Schneiter.

4.3 Gradientes de glicerol

El estado de oligomerización de API se analizó en gradientes de glicerol siguiendo básicamente el protocolo utilizado en Kim y col., 1997. Estos experimentos se llevaron a cabo a partir de extractos crudos (ver apartado 4.1), aplicando sobre los gradientes 100 μ g de proteína total. Los gradientes se formaron con cuatro capas de 1 ml de 50, 40, 30 y 20 % glicerol en MES pH 6,8 20 mM en tubos Ultra-Clear Centrifuge Tubes (11 x 60 mm) de Beckman. La separación de API en los gradientes se hizo centrifugando en rotores de columpio SW60 (Beckman) durante 6 horas a 270.000 x g a 15°C, en una ultracentrífuga Beckman. Se recogió el contenido en 9 fracciones iguales y se precipitaron las proteínas con ácido tricloroacético al 5 % de concentración final. El precipitado se recogió centrifugando 10 minutos a 18.000 x g y se lavó con acetona a -20° C. Las proteínas se disolvieron en el reactivo de Laemmli (Laemmli, 1970) y se analizaron mediante electroforesis, transferencia e inmunodetección de proteínas (ver apartado 4.2). Como referencia de movilidad en los gradientes se aplicó, en un gradiente paralelo, una mezcla de proteínas de diferentes tamaños moleculares.

4.4 Gradientes de ficoll

La asociación a membranas de las proteínas contenidas en un lisado de esferoplastos se estudió mediante el uso de gradientes de ficoll. En este tipo de gradientes las membranas vacuolares y de vesículas prevacuolares flotan, como se ha demostrado mediante el estudio de la distribución de proteínas marcadoras (Scott y Klionsky, 1995). Para llevar a cabo estos experimentos se prepararon esferoplastos con células recogidas en una DO de 1, mediante el siguiente tratamiento: las células se incubaron a 30° C durante 20 minutos en Tris/H₂SO₄, 0,1 M pH 9,4 en presencia de 20 mM DTT. Las células se recogieron mediante centrifugación y se incubaron durante 30 minutos a 30° C con Zymoliasa 20-T (USBiological) en presencia de sorbitol 1,2 M y 20 mM KH₂PO₄, pH 7,4. Los esferoplastos se lisaron osmóticamente en

tampón de lisis (sorbitol 200 mM, MgCl₂ 5 mM, Pipes 20 mM, pH 6,8) durante 20 minutos en hielo. Para eliminar esferoplastos sin lisar se centrifugó el lisado a 500 x g durante 5 minutos a 4° C. El sobrenadante se centrifugó de nuevo a 5.000 x g durante 5 minutos y el sedimento de esta centrifugación se resuspendió en 100 µl de ficoll al 15%, se cubrió con 1,2 ml de ficoll al 13 % y se aplicó una última capa de 100 µl ficoll al 2%. Todas las soluciones de ficoll se prepararon en tampón de lisis. Los gradientes se centrifugaron a 18.000 x g durante 10 minutos. Se recogieron fracciones de 230 µl cuyas proteínas se precipitaron con ácido tricloroacético al 5% y se analizaron por inmunodetección usando anticuerpos específicos (ver apartado 4.2).

4.5 Experimentos de pulso y caza e inmunoprecipitación

4.5.1 Marcaje de las células con ³⁵S-cisteína/metionina y caza

Para estudiar el procesamiento de pAPI en las células al¹⁶a234 y A1a234, estas se cultivaron en medio mínimo hasta una densidad óptica de 1 (se utilizaron 10 ml de cultivo por muestra). En los casos en los que fue necesario ayunar las células, se concentraron centrifugándolas a 3.000 rpm durante 5 minutos, se lavaron con agua y se resuspendieron en el mismo volumen de medio mínimo, sin aminoácidos ni sulfato amónico, durante dos horas. Para el marcaje con ³⁵S-cisteína/metionina (Promix, Amersham Pharmacia Biotech) las células se concentraron 25 veces en el mismo medio (400 µl por muestra), se incubaron a 24 °C (salvo que se especifique otra temperatura) durante media hora, y se marcaron a 24 o 37° C con 500 µCi por muestra. La caza se llevó a cabo centrifugando 15 segundos a 13.000 rpm, lavando con 1 ml de medio mínimo o medio de ayuno conteniendo cisteína 4 mM y metionina 8 mM y diluyendo las células, en el medio de caza, hasta una concentración final 5 veces menor que la inicial (2 ml por muestra). La caza se llevó a cabo a la misma temperatura que el marcaje salvo que se indique lo contrario. A los tiempos indicados se recogieron alícuotas y se les añadió ácido tricloroacético a una concentración final del 5%. Al cabo de 15 minutos a 4° C, se centrifugó 5 minutos a 13.000 rpm, se lavaron las células dos veces con acetona a -20° C y se congelaron en nitrógeno líquido hasta su utilización.

4.5.2 Inmunoprecipitación de las proteínas marcadas

Las células congeladas se resuspendieron en 250 µl de EDTA 1mM, SDS 1%, Tris HCl 50 mM pH 7,5 con la mezcla de inhibidores de proteasas descrita anteriormente (tampón SDS), y se rompieron con bolas de vidrio mediante agitación con vortex durante 2 minutos.

Los extractos celulares se trataron durante 4 minutos a 100° C, se centrifugaron a 18.000 x g durante cinco minutos, se les añadió Tween 20 a una concentración de 0,5% y, después de 30 minutos en hielo, se diluyeron cinco veces con tampón SDS conteniendo NaCl a una concentración final de 0,1 M. Aproximadamente 200 µg de proteína de este extracto, se incubaron en hielo con el anticuerpo policlonal anti API durante 2 horas y, posteriormente, con proteína G-Sefarosa durante 1 hora. Las proteínas retenidas por el anticuerpo después de tres lavados con EDTA 1 mM, NaCl 0,15 M, Tris HCl 50 mM pH 7,5, fueron separadas en electroforesis en condiciones desnaturalizantes y el procesamiento de API se analizó por autoradiografía.

4.6 Experimentos de protección a proteasas *in vitro*

Este tipo de experimentos *in vitro* se utiliza para estudiar si determinadas proteínas están rodeadas por una membrana que las proteja de proteasas que se añaden externamente. Los experimentos se realizaron con células recogidas a una DO de 1, y convertidas en esferoplastos como se muestra en el apartado 4.4. Los esferoplastos se ajustaron a una densidad óptica de 15 en 1 ml de medio SL (sorbitol 1 M, glucosa 1 %, prolina 1 %, YNB sin aminoácidos ni sulfato amónico 0,17 % y los requerimientos auxotróficos adecuados), se incubaron durante 20 minutos a 30° C, o 24° C (en las células a l^{ts}a234), y se marcaron con 1,5 mCi de ³⁵S-cisteína/metionina durante 10 minutos a la temperatura adecuada (ver Resultados). La caza se realizó a la misma temperatura que el marcaje, durante distintos tiempos, diluyendo 10 veces con medio SL conteniendo 8 mM metionina y 4 mM cisteína. Para terminar la caza se añadió 10 mM NaN₃ y los esferoplastos se centrifugaron y lavaron con medio SL. La lisis osmótica se llevó a cabo resuspendiendo los esferoplastos en 1 ml de sorbitol 200 mM, MgCl₂ 5 mM y Pipes 20 mM, pH 6,8, e incubándolos en hielo durante 20 minutos. Los esferoplastos que no se habían lisado se descartaron en el sedimento de una centrifugación a 500 x g durante 2 minutos. Los lisados se incubaron en presencia o ausencia de proteinasa K (Life Technologies) (50 µg/ml) con o sin Tritón X-100 (0,2 %). La digestión con la proteasa se paró añadiendo EDTA 5 mM, y la mezcla de inhibidores de proteasas descrita anteriormente. Las proteínas se precipitaron con ácido tricloroacético al 10 % con la ayuda de BSA 100 µg/ml, se centrifugaron 10 minutos a 13.000 rpm, se lavaron con acetona a -20° C y se resuspendieron en EDTA 5 mM, SDS 1 % y Tris HCl 50 mM pH 7,5. Las proteínas retenidas por el anticuerpo después de tres lavados con EDTA 1mM, NaCl 0,15 M,

Tris HCl 50 mM pH 7,5, se separaron en electroforesis y el resultado se analizó por autoradiografía.

4.7 Identificación de proteínas que interaccionan con la región amino terminal de API

Se cultivaron células W303-1B en 60 ml de SD a 30° C hasta una DO de 1, se recogieron y incubaron en 2 ml de YNB sin aminoácidos ni sulfato amónico, conteniendo NH₄Cl 0,4% y glucosa 0,3% durante media hora y se marcaron metabólicamente con 1 mCi de ³⁵S-SO₄²⁺. Las células marcadas se lavaron con PBS-BS (NaCl 287 mM, KCl 3 mM, Na₂HPO₄ 6 mM, NaH₂PO₄ 1 mM, KH₂PO₄ 1,5 mM) y se rompieron con bolas de vidrio mediante agitación con vortex en 1 ml del mismo tampón conteniendo PMSF 1 mM. El extracto total se centrifugó dos veces consecutivas a 2.000 x g durante 10 minutos, para descartar en el sedimento células sin romper y restos de paredes celulares. El extracto resultante se centrifugó a 150.000 x g, y el sobrenadante (S150) y el sedimento (P150) de esta centrifugación se trataron con PBS-BS conteniendo Tritón X-100 al 2%. Ambas fracciones se volvieron a ultracentrifugar y los sobrenadantes resultantes se utilizaron como material de partida para la búsqueda de proteínas que interaccionan.

El péptido de 43 aminoácidos que corresponde a la región amino terminal de pAPI, MEEQREILEQLKKTQLQMLTVEPSKNNQIANEEKEKKENENSWC, se acopló a una resina de agarosa (Sulfolink, Pierce), siguiendo las instrucciones del fabricante. Las fracciones S150 y P150 se diluyeron para rebajar la concentración de Tritón X-100 y se incubaron a 4° C con la resina durante una noche. La resina se lavó tres veces durante 15 minutos con PBS-BS/ Tritón X-100 0,5%, una vez durante 15 minutos con tampón para elución salina, TES (NaCl 1,137 M, KCl 3 mM, Na₂HPO₄ 6 mM, NaH₂PO₄ 1 mM, KH₂PO₄ 1,5 mM, Tritón X-100 0,5%), y una vez, rápidamente, con agua fría. Alícuotas del extracto crudo, S150 y P150, eluciones salinas y la resina se trataron a 100° C en el reactivo de Laemmli y las proteínas fueron separadas por electroforesis en gel de poliacrilamida. Los geles fueron analizados por tinción con el reactivo de Coomassie y por autoradiografía.

La identificación de la banda de 70 kDa detectada en la elución con Laemmli de las proteínas de S150 unidas a la resina, se llevó a cabo en el laboratorio del Dr. J. Vandekerckhove. Brevemente, la banda se recortó, se digirió con tripsina, y los péptidos resultantes se separaron por cromatografía de tipo RP-HPLC, se concentraron con el sistema de Poros R2 (PerSeptive Biosystems) y se ionizaron mediante el sistema MALDI (matrix assisted laser desorption-ionization). Para la identificación de proteínas, los péptidos se

analizaron por el sistema PSD (post-source decay). Una vez conocida la masa de los péptidos se buscó en una bases de datos a qué secuencia codificante correspondían (en la figura 21 se muestran las fases que se siguieron para la identificación de las proteínas).

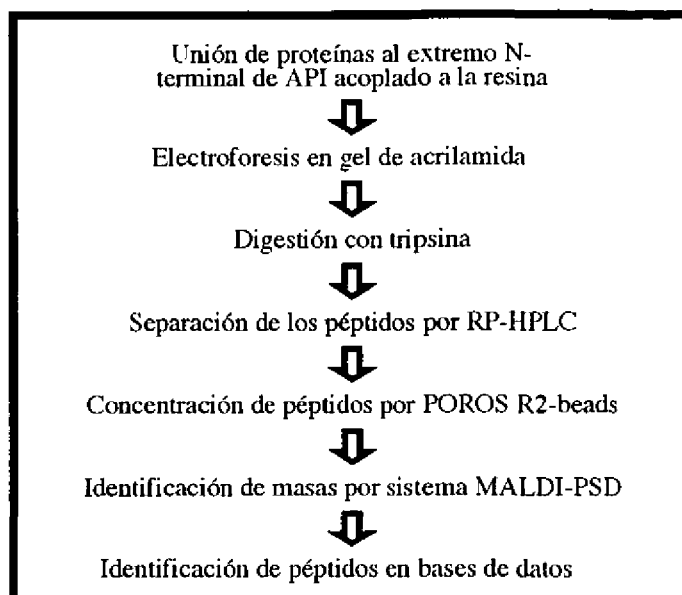


Fig. 21 Fases para la identificación de proteínas que se unen al extremo amino terminal de API. En este esquema se representan los pasos seguidos para identificar las proteínas que interaccionan con el extremo amino terminal de API (ver Materiales y Métodos y Resultados)

5. Estudios de interacción de proteínas mediante el sistema de dos híbridos

La cepa PJ69-4A (auxótrofa para leucina, triptófano, histidina y adenina), se transformó con las construcciones adecuadas en los plásmidos pGBT9 y pACT2. Los transformantes se seleccionaron en placas de medio mínimo sin leucina ni triptófano y se estudió la interacción entre las proteínas híbridas, comprobando la capacidad de crecimiento de las cepas en placas de medio mínimo $\text{Leu}^- \text{Trp}^- \text{Ade}^- \text{His}^-$, en presencia de 3-aminotriazol 5 mM. Para cuantificar la interacción, la actividad β -galactosidasa se midió colorimétricamente a partir de extractos crudos, utilizando ONPG como sustrato (Adams y col., 1997).

6. Analisis de supervivencia en ayuno de nitrógeno

Las células cultivadas en SD (10 ml) hasta una DO de 1 se centrifugaron, se recogieron, se lavaron con agua, se resuspendieron en 10 ml de SD(-N) y se incubaron a 30°C durante varios días con agitación. A distintos tiempos (nada más ser transferidas al nuevo medio, 1, 3, 6, 8 y 10 días), se tomaron alícuotas de las células, se diluyeron adecuadamente y se extendieron por triplicado en placas de YPD. Al cabo de 3 días a treinta grados, se contó el número de colonias.

7. Microscopía de fluorescencia

Se cultivaron células de levadura expresando GFP-Cvt19p o Cvt19 Δ C32-GFP, en medio mínimo (con todos los requerimientos a 100 μ g/ml excepto la metionina que se añadió a 10 μ g/ml), hasta una DO de 1,2, y, en los casos en los que se indica, se ayunaron como se ha descrito en el mismo volumen de SD(-N) durante dos horas. Después de recoger las células y lavarlas con PBS, se observaron al microscopio de fluorescencia (Zeiss Axiophot) y se fotografiaron utilizando películas de 400 ASA de sensibilidad.

Resultados

Resultados

El estudio y conocimiento de la ruta de transporte de API a la vacuola de *Saccharomyces cerevisiae* ha avanzado considerablemente en los últimos años. Los Resultados en esta memoria se muestran esencialmente según el orden en que se fueron obteniendo, de manera que, de algún modo, se pueden examinar desde un punto de vista histórico. Una vez demostrada la importancia de la región amino terminal de la proteína API para su transporte a la vacuola se estudió el papel de la chaperona citosólica Ssa1p, capaz de interactuar *in vitro* con esta región, en el transporte de API. El avance en los estudios masivos de interacción entre proteínas permitió descubrir la interacción entre API y Cvt19p. Esto permitió a su vez estudiar la función de esta proteína en la ruta de transporte de API desde el citoplasma a la vacuola.

1. Ssa1p y Ssa2p, miembros de la familia de las Hsp70, interactúan con el extremo amino terminal de API

Al comienzo de este trabajo se conocía que la secuencia amino terminal de API, formada por 45 aminoácidos, es necesaria para el transporte de la proteína a la vacuola (Seguí-Real y col., 1995; Oda y col., 1996). Posteriormente los grupos de D. J. Klionsky y Y. Ohsumi (Baba y col., 1997), presentaron un análisis bioquímico y morfológico de la ruta de transporte de API en el que se mostraba que API es rodeada por una membrana para dar lugar a una vesícula transportadora que se fusiona con la vacuola, estableciendo, por tanto, la naturaleza vesicular del transporte de API en contraposición a su posible translocación a través de la membrana vacuolar. Más adelante demostramos en colaboración con el laboratorio del Dr. I. V. Sandoval que el prepro-péptido de API contiene la información necesaria y suficiente para conducir una proteína testigo a la vacuola (Martínez y col., 1999). Por otro lado se sabía que la sobreexpresión de API conduce a una

acumulación de su forma precursora en el citoplasma (Klionsky y col., 1992), indicando que existe un componente saturable en la ruta cvt. Todos estos hechos experimentales sugerían la posibilidad de que el prepro-péptido hubiera de ser reconocido por un receptor que mediara su incorporación específica a las vesículas transportadoras. Por todo esto, con la idea de que aquellas proteínas que interaccionaran con el prepro-péptido podrían estar implicadas en el transporte de la aminopeptidasa a la vacuola, se abordó la búsqueda de proteínas que fueran capaces de interaccionar *in vitro* con el extremo amino terminal de API. Los experimentos que se relatan a continuación fueron llevados a cabo en colaboración con los laboratorios de los doctores I. V. Sandoval y J. Vandekerckhove. Se acoplaron los 43 primeros aminoácidos de la aminopeptidasa I, es decir, el péptido MEEQREILEQLKKTQLMLTVEPSKNNQIANEEKEKKEKENSWC, a una resina de agarosa y se estudió su interacción con las proteínas de un extracto de *Saccharomyces cerevisiae*. Para ello se marcaron células silvestres W303-1B con $^{35}\text{S-SO}_4^{2+}$ y, después de romper las células, se separó el extracto crudo en dos fracciones en una centrifugación de $150.000 \times g$ (S150 y P150). Ambas fracciones se solubilizaron con Tritón X-100 y se incubaron con la resina con objeto de analizar las proteínas eventualmente retenidas.

El tratamiento de la resina con solubilizador de Laemmli y el análisis del eluido mediante electroforesis en un gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes, dio como resultado la retención de una o más proteínas de un tamaño molecular aproximado de 70 kDa, presentes tanto en P150 como en S150. Aunque las proteínas se detectaron inicialmente por autoradiografía, eran visibles también en el gel teñido con Coomassie (Fig. 22A). La zona correspondiente a 70 kDa del gel se analizó por espectrometría de masas en el laboratorio de J. Vandekerckhove. Para ello la banda del gel se recortó y se digirió con tripsina. Los péptidos correspondientes se separaron por cromatografía RP-HPLC, se concentraron por el sistema de POROS R2-beads y se analizó su masa por el sistema MALDI. Uno de los iones peptídicos obtenidos se sometió a análisis PSD (Fig. 22B) y de este modo se pudo identificar una secuencia peptídica que, tras una búsqueda en una base de datos no redundante condujo a la identificación del péptido NH_2 -FKEEDEKESQR-COOH contenido en Ssa1p y en Ssa2p. Posteriormente se llevó a cabo el análisis MALDI-PSD de cuatro iones peptídicos adicionales (Fig. 22C), lo que permitió confirmar la presencia de ambas proteínas, Ssa1p y Ssa2p, en la banda analizada.

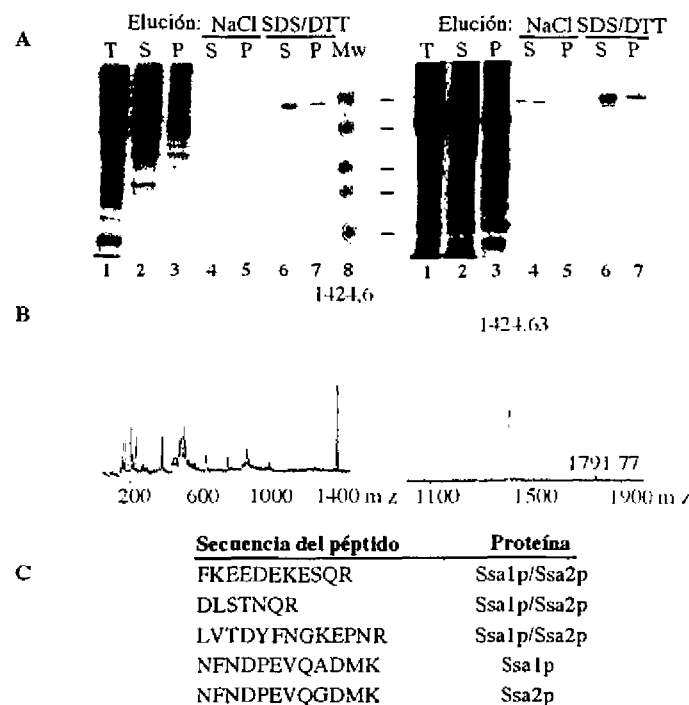


Fig. 22 Interacción *in vitro* entre la región amino terminal de API y chaperonas citosólicas de la subfamilia Ssa. (A) Retención de un polipéptido de 70 KDa en la resina Sulfolink acoplada al péptido prepro. Células de la cepa silvestre W303-1b se marcaron con [S-35] cisteína y metionina, se recogieron, lavaron y rompieron con bolas de vidrio. Las fracciones, S150 y P150, obtenidas a partir del extracto total, se solubilizaron con Tritón X-100, se incubaron con la resina prepro-Sulfolink, y la resina se lavó y eluyó, todo ello como se describe en Materiales y Métodos. En la figura se muestra la tinción con azul de Coomassie (panel izquierdo) y la autoradiografía (panel derecho) de un gel de poliacrilamida, en condiciones desnaturalizantes, en el que se resolvieron alcuotas de las fracciones obtenidas: extracto total (carril 1); S150 (carril 2); P150 (carril 3); proteínas de S150 y P150 retenidas en la resina y eluidas con NaCl 1M (carriles 4 y 5); proteínas de S150 y P150 retenidas en la resina y eluidas con solubilizador de Laemmli (carriles 6 y 7); marcadores de tamaño (carril 8). (B) Caracterización del polipéptido de 70 KDa como Ssa1p/Ssa2p mediante análisis de espectroscopía de masas. Los péptidos, derivados de la digestión con tripsina de las proteínas de 70 kDa retenidas por la resina, se separaron por RP-HPLC y se analizaron mediante espectroscopía de masas MALDI (panel izquierdo) y el pico de 1424 m/z fue sometido a análisis de tipo PSD (panel derecho). (C) Se muestran algunos de los péptidos identificados pertenecientes a Ssa1p y Ssa2p o sólo a una de ellas.

Para estudiar más profundamente la interacción entre estas dos chaperonas y la extensión amino terminal de la forma precursora de API, se investigó si una forma mutada del prepro péptido era capaz de interactuar con Ssa1p y Ssa2p. La mutación que se estudió consistía en la substitución de la isoleucina en posición 7 por una glicina. Anteriormente (Martínez y col., 1997), había sido descrito que esta mutación interrumpe la estructura en α -hélice de la parte pre de la extensión amino terminal de API impidiendo su transporte y procesamiento. Se observó que la mutación en la posición 7 no impedía la retención de Ssa1p y Ssa2p por la resina acoplada al péptido (resultado no mostrado). Este resultado parece indicar que las dos chaperonas reconocen

el procesamiento de API. Para ello células al¹⁵a234 fueron preincubadas a 37° C durante media hora y después pulsadas y cazadas a 24° C. La conversión de la forma precursora de API en la forma madura fue analizada por inmunoprecipitación con el anticuerpo específico contra la proteína como hemos descrito anteriormente. Se puede observar en la figura 24 cómo se produce progresivamente la conversión a la forma madura entre los 60 y 120 minutos. De este resultado se puede concluir que la inhibición del transporte de pAPI cuando las células están en condiciones restrictivas es reversible. Cuando las células se marcaron a 37° C y se cazaron a la temperatura permisiva el procesamiento era similar. Este resultado sugiere que, aunque pAPI sea sintetizada a la temperatura restrictiva, puede ser transportada a la vacuola cuando se recupera el funcionamiento de la ruta, indicando que la proteína sintetizada en ausencia de una chaperona funcional no es degradada, ni se pliega incorrectamente de manera que sea irrecuperable.

3. Ssa1p no es necesaria para la dodecamerización de pAPI

Tras su síntesis en el citoplasma, pAPI se organiza en dodecámeros (Kim y col., 1997) antes de asociarse en los llamados complejos cvt que posteriormente interaccionarán con el sistema de transporte. Para determinar si Ssa1p es necesaria en un paso anterior o posterior a la oligomerización decidimos estudiar si pAPI se encuentra mayoritariamente formando dodecámeros en la cepa mutante a 37° C. La formación del oligómero se puede detectar mediante el estudio de su movilidad en gradientes de glicerol. En este tipo de gradientes las proteínas o complejos proteicos migran, esencialmente, en función de su tamaño. Para realizar este estudio se utilizó la cepa al¹⁵a234Δ*ape1* transformada con el plásmido pEMBLyex4-APE1. Estas células, con la copia cromosómica del gen API deletada, expresan el gen contenido en el plásmido en presencia de galactosa y la expresión está reprimida en presencia de glucosa. Las células, cultivadas en medio mínimo utilizando la rafinosa como fuente de carbono, se indujeron con galactosa durante cuatro horas a 24 o 37 ° C. Los extractos crudos correspondientes fueron sometidos a un gradiente de glicerol (las condiciones se especifican en Materiales y Métodos). En la figura 25 se puede observar como en las células silvestres, API migra hasta las fracciones 4 y 5, a la misma altura que la tiroglobulina cuyo tamaño es de 669 kDa: esta movilidad es consistente con el tamaño de los dodecámeros (61 kDa x 12= 732 kDa, forma precursora; 50 kDa x 12= 600 kDa). En el caso de las células inducidas con galactosa a la temperatura restrictiva, la

movilidad de la forma precursora era la misma que tras la inducción a 24 ° C, indicando que pAPI se encuentra mayoritariamente en forma de dodecámero. Estos resultados sugieren que Ssa1p no es necesaria para la formación de dodecámeros de pAPI y se puede deducir que la chaperona actúa en un paso posterior de la ruta de transporte.

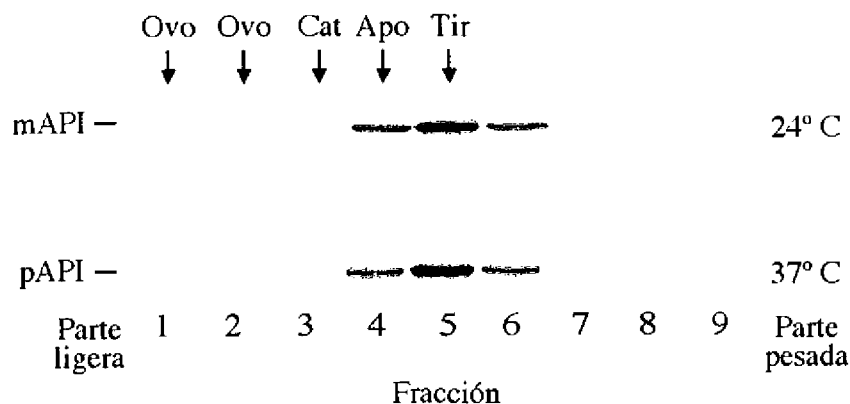


Fig. 25 Estado de oligomerización de API en células $\alpha 1^{\text{ts}}\alpha 234$ tratadas a 24 o 37°C. Extractos obtenidos de células $\alpha 1^{\text{ts}}\alpha 234\Delta\text{ape1}$ transformadas con un plásmido portador de *APE1* bajo el control del promotor de *GALI*, e inducidas con galactosa durante 4 horas, se fraccionaron en gradientes de glicerol para distribuir las proteínas según su tamaño (ver Materiales y Métodos). La movilidad de *APE1* se estudió por inmunotransferencia utilizando un anticuerpo contra API. Como patrones de movilidad en los gradientes se utilizaron ovoalbúmina (Ovo, 45 kDa), catalasa (Cat, 240 kDa), apoferritina (Apo, 450 kDa) y tiroglobulina (Tir, 669 kDa).

4. pAPI permanece desprotegida en células $\alpha 1^{\text{ts}}\alpha 234$

Como se ha explicado anteriormente, los datos mostrados por el grupo de D. J. Klionsky (Baba y col., 1997) probaron que la entrada de API en la vacuola se lleva a cabo mediante transporte vesicular y no por translocación a través de la membrana. Tras la asociación de pAPI a la membrana de la pre-vesícula cvt o pre-autofagosoma, ésta se cierra (formándose la vesícula) y se dirige hacia la vacuola para fusionarse con ella (Scott y col., 1997). Con la intención de definir mejor el papel de Ssa1p en el transporte de la aminopeptidasa a la vacuola se estudió si en la cepa $\alpha 1^{\text{ts}}\alpha 234$, y a la temperatura restrictiva, pAPI permanecía en el citoplasma o estaba atrapada en el interior de una vesícula cvt. En el caso de que la formación de una vesícula se haya completado, su contenido no podrá ser accesible a menos que se rompa la membrana vesicular. Ello permite utilizar la accesibilidad a la acción de una proteasa añadida *in vitro* como herramienta para determinar qué estado de la ruta está bloqueado en un mutante. En estos ensayos es necesario partir de un lisado celular en el que permanezcan intactos los orgánulos intracelulares, para lo cual, tras eliminar la pared celular se lisan suavemente los esferoplastos mediante un choque

La inmunoprecipitación de los extractos obtenidos, con un anticuerpo contra CPY, una proteasa vacuolar que viaja a este orgánulo a través de la ruta secretora, se utilizó como control en estos experimentos (Fig. 26B). Después de dos minutos de caza la mayoría de la proteína se encontraba en su forma precursora y protegida de la proteinasa K como es de esperar de una proteína cuyo transporte al retículo endoplásmico es co-traducciona. La presencia de Tritón X-100 permitió, sin embargo, la conversión de la forma precursora de la carboxipeptidasa, pCPY, en la forma madura, mCPY. Después de cuatro horas de caza la proteína ya había alcanzado su forma madura, resistente a proteasas. Estos resultados, consistentes con el transporte de CPY a la vacuola por la ruta secretora confirman la validez del ensayo de protección a proteasas para establecer la incorporación de API a las vesículas de transporte. Este experimento muestra que, a temperatura restrictiva, toda la forma precursora de API permanece desprotegida y permite concluir que la chaperona Ssa1p interviene en un paso anterior a la incorporación de pAPI a las vesículas cvt.

5. La proteína Cvt19p interacciona con API en un ensayo de dos híbridos

La interacción entre dos proteínas en la célula puede indicar que ambas están implicadas en el mismo proceso. Una manera de relacionar proteínas funcionalmente es estudiar qué proteínas son capaces de interactuar entre sí. En un estudio de dos híbridos a gran escala con todo el genoma de la levadura, se detectó la interacción entre API y Cvt19p. Cvt19p era en ese momento una proteína de función desconocida, con una homología del 33% con otra proteína de *Saccharomyces cerevisiae*, también de función desconocida: Yo1083p. No se encontraron más homólogos en la base de datos. Tampoco presentaba ningún dominio funcional conocido que permitiera hacer predicciones sobre su función. Según se deduce de su secuencia de aminoácidos tiene una masa molecular teórica de 47.5 kDa y carácter hidrofílico sin dominios transmembrana. Las células con la copia genómica de *CVT19* interrumpida son viables y no presentan ningún fenotipo evidente. Para confirmar y caracterizar la interacción entre las dos proteínas, se llevaron a cabo ensayos de dos híbridos en el laboratorio. *CVT19* se fusionó en trama en posición 3' respecto a la zona codificante del dominio de activación del factor de transcripción de Gal4p, en el vector pACT2. *APE1* se subclonó en el plásmido pGBT9, de manera que API quedaba en trama, y en posición C-terminal, con la región de interacción con el DNA de Gal4p. El

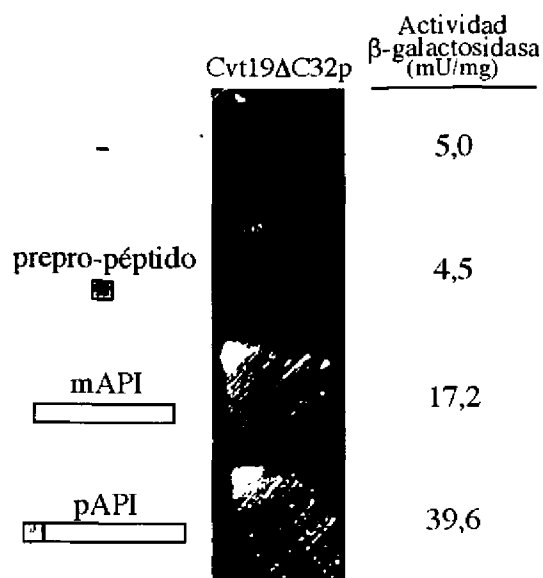


Fig. 27 Estudio de interacción de pAPI, mAPI y preproAPI con Cvt19p mediante el sistema de dos híbridos. La cepa PJ69-4A se cotransformó con distintos plásmidos que expresaban la forma precursora, madura o la extensión amino terminal de API, fusionados en fase con el dominio de unión al DNA del factor de transcripción Gal4p y la proteína Cvt19p en fase con el dominio de activación de la transcripción de Gal4p. En la imagen se muestra el crecimiento en placa de SD, en ausencia de los marcadores de selección adenina, histidina, triptófano y leucina y en presencia de 3-aminotriazol 5mM, después de tres días a 30° C, y la actividad β -galactosidasa (mU/mg proteína) medida en los extractos obtenidos a partir de estas cepas.

crecimiento de las células cotransformadas con estos plásmidos en ausencia de adenina e histidina, así como la expresión del gen de la β -galactosidasa, indicó la interacción entre las dos proteínas híbridas, confirmando el resultado del estudio masivo (Fig. 27). De idéntica manera se estudió la interacción de algunas versiones truncadas de API y Cvt19p (Fig. 28). Ninguna de las versiones truncadas en el extremo carboxilo de API mostraron interacción con Cvt19p, a excepción de aquella en la cual habían sido eliminados sólo los últimos 10 aminoácidos: así, tanto la ausencia de los 100 aminoácidos C-terminales, como también la falta de aproximadamente la mitad carboxilo terminal de la proteína (hasta el aminoácido 257, resultado no mostrado), impedían la interacción. Por último, dado el papel relevante de la región prepro en el transporte de API, probamos una construcción que contenía únicamente los 45 residuos amino terminales. El resultado (Fig. 27) indicó que este péptido no era capaz de interactuar por sí solo con Cvt19p y nos preguntamos entonces si mAPI lo era. Como se muestra en la figura, la forma madura sí es capaz de interactuar pero de una manera menos eficaz (17,2 miliunidades de actividad β -galactosidasa/miligramo de proteína contra 39,6 en el caso de pAPI). Estos resultados sugieren que mAPI es necesaria para la interacción con Cvt19p pero que la interacción es más efectiva en presencia del prepro-péptido. Como veremos más adelante los 32 aminoácidos de la zona C-terminal de Cvt19p son necesarios para su función. Por este motivo quisimos saber si son también necesarios para la interacción con API. Se construyó una nueva proteína híbrida en la que Cvt19 Δ C32p se fusionó con el motivo de activación de Gal4p. Se puede deducir del

resultado de la interacción entre ambas quimeras (Fig. 28) que este extremo C-terminal no es

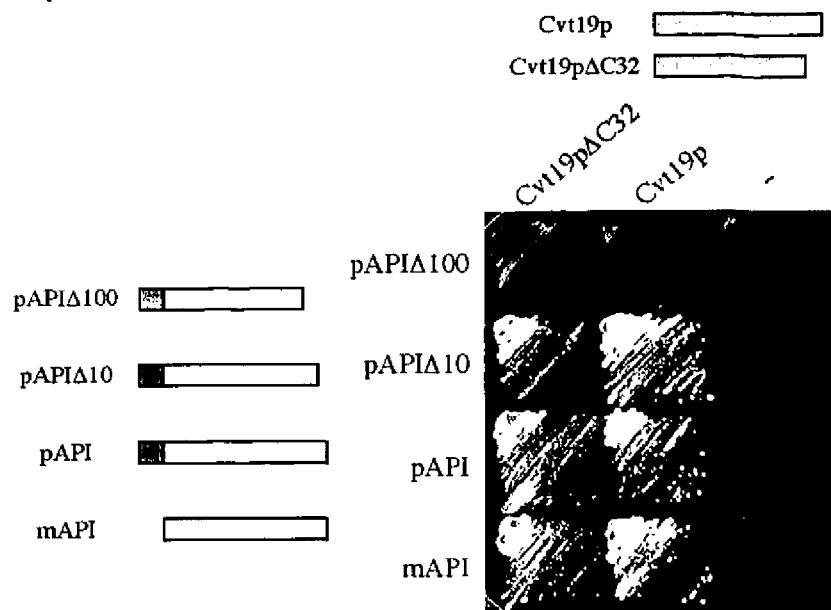


Fig. 28 Interacción entre distintas formas derivadas de API y Cvt19p mediante el sistema de dos híbridos. La cepa PJ69-4A se cotransformó con distintos plásmidos que expresaban distintos fragmentos de API y de Cvt19p fusionados en fase con el dominio de unión a DNA del factor de transcripción Gal4p, o con el dominio de activación de la transcripción de Gal4p, respectivamente. En la figura se muestra el crecimiento en placa de SD en ausencia de los marcadores de selección adenina, histidina, triptófano y leucina y en presencia de 3-aminotriazol 5mM, después de tres días a 30° C.

necesario para la interacción entre ambas proteínas.

6. Cvt19p es necesaria para el transporte de API a la vacuola

Dado el resultado que demuestra la interacción entre Cvt19p y API en el ensayo de dos híbridos, interacción que es más fuerte con la forma precursora, nos planteamos estudiar si Cvt19p es requerida para el transporte de la aminopeptidasa a la vacuola. Para ello se comparó el procesamiento de pAPI en extractos crudos de la cepa silvestre BY4741 y en la misma cepa con

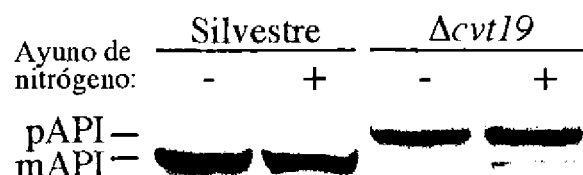


Fig. 29 Procesamiento de API en células Δ cvt19. Células silvestres o Δ cvt19 se cultivaron en medio SD hasta una densidad óptica de 1 y se transfirieron a medio SD(-N) durante dos horas (ayuno de nitrógeno). Se prepararon extractos crudos y se analizó mediante inmunotransferencia, como se describe en Materiales y Métodos, el procesamiento de la proteína API en las distintas cepas y condiciones.

el gen *CVT19* delecionado, detectando la proteína por inmunotransferencia después de una separación en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes. Este experimento se llevó a cabo con las células en medio de crecimiento o tras incubarlas en medio mínimo con glucosa y sin aminoácidos, ni otra fuente de nitrógeno, durante dos horas. Se puede observar (Fig. 29) cómo en fondo $\Delta cvt19$, en las dos condiciones, la mayoría de API se encuentra en su forma precursora. Este resultado pone de manifiesto que Cvt19p juega un papel en el transporte de API a la vacuola. El efecto de la deleción del gen podía ser indirecto, es decir, podía afectar al transporte de API a través de su efecto sobre otros elementos de la ruta. Se estudió entonces el transporte de la carboxipeptidasa Y en la cepa silvestre y en la cepa interrumpida para *CVT19*. Se puede observar en la figura 30 cómo CPY se encuentra en su forma madura tanto en la cepa silvestre como en el fondo $\Delta cvt19$ en las dos condiciones metabólicas utilizadas para el estudio del procesamiento de API. Como control negativo se añadió en el experimento una muestra procedente de una cepa carente del gen que codifica para la proteasa vacuolar Pep4p, necesaria

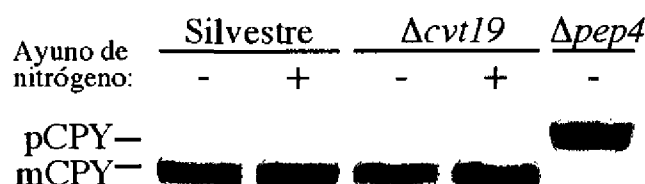


Fig. 30 Procesamiento de CPY en células $\Delta cvt19$. Células silvestres o $\Delta cvt19$ se cultivaron en medio SD hasta una densidad óptica de 1 y se transfirieron a medio SD(-N) durante dos horas (ayuno de nitrógeno). Se prepararon extractos crudos y se analizó mediante inmunotransferencia, como se describe en Materiales y Métodos, el procesamiento de la proteína CPY en las distintas cepas y condiciones. Como control se analizó la movilidad de CPY en una cepa, $\Delta pep4$, incapaz de procesar esta proteína.

para el procesamiento de CPY desde su forma precursora a la madura. En este control se observa que CPY se encuentra en forma precursora.

Para confirmar el papel de Cvt19p en la ruta de transporte de API a la vacuola se llevó a cabo un estudio de complementación del fenotipo mutante en la cepa interrumpida, $\Delta cvt19$, transformada con un plásmido multicopia que contiene el gen *CVT19* bajo el control del promotor del gen *GALI*. Las células se transfirieron a medio mínimo con galactosa, para inducir la expresión del gen, y se tomaron muestras a distintos tiempos desde el momento de la inducción. En la figura 31 se muestra como, ya a las dos horas de inducción, se puede observar la aparición de la forma madura, mAPI. Al cabo de seis horas la mayor parte de API ha sido

procesada. El plásmido vacío es incapaz de complementar el fenotipo incluso a las seis horas de incubación con galactosa. Por otra parte resulta interesante señalar que la sobreexpresión de *CVT19* en el fondo silvestre no retrasa el procesamiento de API, lo que parece indicar que la sobrecarga de la proteína no afecta al transporte de la aminopeptidasa. Estos resultado ponen de

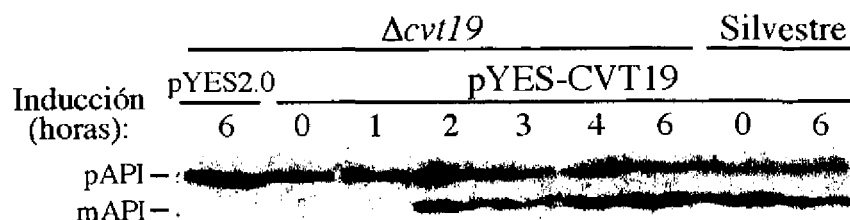


Fig. 31 Complementación de la capacidad de procesamiento de API en células $\Delta cvt19$. Células $\Delta cvt19$ o silvestres que expresaban *Cvt19p* bajo el control del promotor *GAL1* se cultivaron hasta una densidad óptica de 1 en medio mínimo con rafinosa como fuente de carbono, se transfirieron a medio mínimo con galactosa y se tomaron muestras a los tiempos de inducción indicados. Los extractos obtenidos a partir de estas muestras se analizaron por inmunotransferencia como se describe en Materiales y Métodos. Como control se analizó el procesamiento de API en las células mutantes transformadas con el plásmido vacío e incubadas durante 6 horas con galactosa.

manifiesto que *CVT19* codifica una proteína necesaria para el transporte de Aminopeptidasa I a la vacuola de *Saccharomyces cerevisiae*.

7. *Cvt19p* no es necesaria para la dodecamerización de pAPI

Como hemos mencionado anteriormente, después de su síntesis en el citoplasma, pAPI se organiza en dodecámeros antes de asociarse con la maquinaria de transporte a la vacuola. Una forma de saber si *Cvt19p* actúa en un paso anterior o posterior a la formación de los dodecámeros es estudiar, en la cepa interrumpida en *CVT19*, si pAPI se encuentra como dodecámero. Para ello se analizó su movilidad en gradientes de glicerol. Extractos crudos procedentes de las cepas

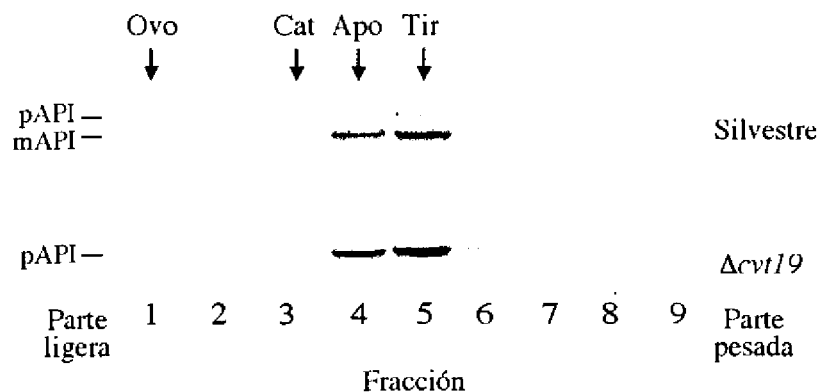


Fig. 32 Estado de oligomerización de API en células $\Delta cvt19$. Extractos obtenidos de células silvestres o $\Delta cvt19$ se fraccionaron en gradientes de glicerol para distribuir las proteínas según su tamaño (ver Materiales y Métodos). La movilidad de mAPI y pAPI se analizó por inmunotransferencia utilizando un anticuerpo contra API. Como patrones de movilidad en los gradientes se utilizaron ovoalbúmina (Ovo, 45 kDa), catalasa (Cat, 240 kDa), apoferritina (Apo, 450 kDa) y tiroglobulina (Tir, 669 kDa).

silvestre y mutante que habían crecido en medio mínimo se sometieron a un gradiente de glicerol (ver Materiales y Métodos). En el mismo experimento también se llevó una muestra con marcadores de movilidad. Se puede observar (Fig. 32) cómo, en las células silvestres, API migra hasta las fracciones 4 y 5, a la misma altura que la tiroglobulina: esta movilidad es consistente con el tamaño de los dodecámeros (Kim y col., 1997). En el caso de las células $\Delta cvt19$, la movilidad de la forma precursora es indistinguible de la movilidad en las células de la cepa silvestre, indicando que pAPI se encuentra mayoritariamente en forma de dodecámero en ausencia de Cvt19p. Estos resultados indican que Cvt19p no es necesaria para la formación de dodecámeros de pAPI y por lo tanto que la proteína Cvt19p debe actuar en un paso de la ruta a la vacuola posterior a la formación del oligómero.

8. pAPI permanece desprotegida en células $\Delta cvt19$

Según el modelo vigente de la ruta de transporte (Abeliovich y Klionsky, 2001), después de la asociación de pAPI a la membrana de la pre-vesícula cvt o autofagocítica, esta se cierra (formándose la vesícula) antes de dirigirse hacia la vacuola. Quisimos saber si en el caso de las células $\Delta cvt19$, pAPI se encontraba protegida en el interior de vesículas o si por el contrario se encontraba accesible a proteasas. Como se describió en el apartado 4 de esta misma sección es posible determinar si pAPI es accesible *in vitro* en ensayos de protección a proteasas, en un lisado de esferoplastos, con los orgánulos intracelulares intactos, incubado en presencia de Proteinasa K. En el experimento que se muestra en la figura 33, se partió de esferoplastos marcados con ^{35}S -cisteína/metionina durante 10 minutos y sometidos a una caza, con exceso de los aminoácidos no marcados. La caza se llevó a cabo durante 2 minutos o 2 horas, para estudiar la accesibilidad de pAPI inmediatamente después de su síntesis, o a las dos horas, cuando en células silvestres API ya ha alcanzado la vacuola y ha sido procesada. Los esferoplastos lisados osmóticamente se incubaron con proteinasa K como ya se ha descrito anteriormente. La movilidad de API se estudió inmunoprecipitando API con un anticuerpo específico y analizando su tamaño en una autoradiografía después de separar las proteínas en electroforesis. En paralelo se llevaron los controles sin proteinasa K y con Tritón X-100 (además de la proteinasa K). Tanto en células silvestres como interrumpidas en el gen *CVT19* se puede observar, en la misma figura, que la mayoría de API se encuentra en forma precursora tras la caza a los dos minutos, y es accesible a

la proteasa, puesto que se encuentra en su forma madura aún en ausencia de detergente. Este resultado está en concordancia con el hecho de que pAPI se sintetiza en el citosol y, a tiempos tan cortos después de su síntesis, todavía no se encuentra rodeada por una membrana que la proteja de la acción de la proteasa.

Cuando este mismo experimento se llevó a cabo después de cazar los esferoplastos durante dos horas (Fig. 33) se puede observar que, en las células $\Delta cvt19$, API se encuentra en su forma precursora y accesible a la proteasa, mientras que está totalmente procesada en la cepa silvestre. Este resultado indica que pAPI, en la cepa mutante, no ha sido incorporado a vesículas transportadoras. Basándonos en estos resultados podemos concluir que Cvt19p interviene en un paso de la ruta anterior a la inclusión de pAPI en las vesículas transportadoras.

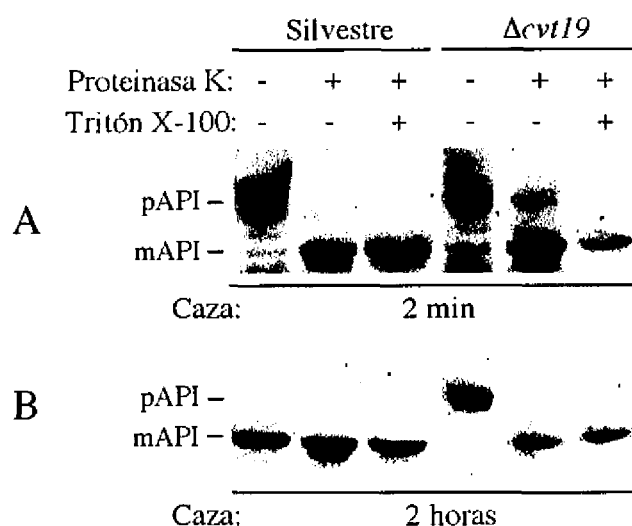


Fig. 33 Ensayo de protección frente a proteasas de API obtenida de lisados de células $\Delta cvt19$. Esferoplastos formados a partir de las células silvestres o $\Delta cvt19$ se marcaron metabólicamente con ^{35}S -cisteína/metionina y se sometieron a una caza con cisteína y metionina no radiactivas, durante dos minutos o dos horas, como se describe en Materiales y Métodos. Los esferoplastos se lisaron osmóticamente y el lisado se incubó durante 30 minutos en hielo con o sin proteínasa K (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) y en presencia o ausencia del detergente Tritón X-100 (0,2%). API se inmunoprecipitó con anticuerpo conjugado con Proteína G-Sefarosa y el inmunoprecipitado se analizó mediante electroforesis en gel de poliacrilamida y autoradiografía.

9. API no se asocia a membranas en células $\Delta cvt19$

El resultado del experimento anterior nos indica que en las células $\Delta cvt19$, pAPI no se encuentra protegido por membranas. Este hecho no excluye la posibilidad de que en este fondo genético la proteína API se encuentre asociada a una vesícula que no ha llegado a cerrarse. Por lo tanto es sumamente interesante estudiar si pAPI está asociada a una fracción de membranas en

células en el fondo mutante en *CVT19*. La asociación a membranas puede ser estudiada mediante un fraccionamiento subcelular que permita obtener una fracción enriquecida en membranas vacuolares y prevacuolares. Se ha descrito que en un gradiente de Ficoll las membranas vacuolares y prevacuolares flotan (Scott y col., 1995), formando una banda en la parte superior del gradiente, mientras que los grandes complejos proteicos quedan en el sedimento y las proteínas citoplasmáticas solubles en las fracciones intermedias.

Para estudiar si la asociación de pAPI a membranas es dependiente de Cvt19p, se lisaron osmóticamente los esferoplastos de células $\Delta cvt19$ y silvestres y se centrifugaron a 5.000 x g para concentrar API en el sedimento. Está descrito que esta proteína sedimenta a esa velocidad, probablemente gracias a que está asociada en los complejos llamados cvt (Scott y Klionsky, 1995). El sedimento de 5.000 x g se resuspendió y se aplicó en un gradiente de Ficoll (ver Materiales y Métodos). Como se muestra en la figura 34, en las células silvestres, la mayoría de API se detecta en la parte superior del gradiente, enriquecida en vacuolas, y ello se debe a su interacción con membranas, como lo muestra el hecho de que el tratamiento previo con Tritón X-100 impide la flotación (resultado no mostrado). En el caso de las células $\Delta cvt19$, la mayor parte de pAPI es incapaz de flotar sobre el Ficoll. Este hecho sugiere que en ausencia de Cvt19p, la asociación de API a las estructuras que van a formar las vesículas cvt o autofagosomas está afectada. Además, la flotación en el Ficoll de pAPI procedente de células $\Delta cvt19$ transformadas con el plásmido pGFP-CVT19, que codifica una fusión funcional de Cvt19p a la proteína verde (ver más abajo), confirma la necesidad de Cvt19p para la asociación eficiente de API a membrana.

Como control se estudió la movilidad en el gradiente de Ficoll de la proteína vacuolar CPY. Como se ha demostrado en esta memoria CPY viaja a la vacuola de forma independiente de Cvt19p, y por ello ha de localizarse en la vacuola en las células $\Delta cvt19$. En la figura 34 se puede ver que esta proteína aparece en la fracción que flota en el gradiente de Ficoll, donde se localizan las vacuolas. Este resultado confirma, además, que en las condiciones en que se lleva a cabo la lisis de los esferoplastos no se produce rotura de las vacuolas, ya que de ser así, y al ser CPY una proteína soluble, no aparecería asociada a la fracción vacuolar.

En resumen, de estos experimentos podemos concluir que en ausencia de Cvt19p, pAPI está en un estado accesible a proteasas y se ha roto su interacción con la maquinaria de

transporte. Cvt19p actúa en un paso de la ruta posterior a la oligomerización de pAPI y anterior a su interacción con la pre-vesícula.

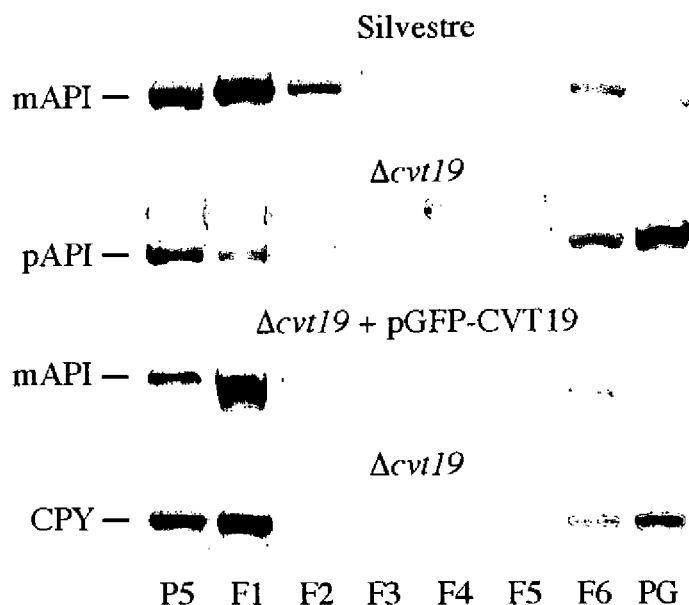


Fig. 34 Asociación a membranas de API y CPY en células $\Delta cvt19$. Esferoplastos de células silvestres o $\Delta cvt19$ transformadas (panel inferior) o no con el plásmido pGFP-CVT19 se lisaron osmóticamente. El lisado, después de una centrifugación a 500 g para eliminar esferoplastos sin romper, se sometió a una centrifugación a 5.000 g y el sedimento (P5) se fraccionó mediante centrifugación diferencial por flotación en un gradiente discontinuo de Ficoll, como se describe en Materiales y Métodos. Las distintas fracciones y el pellet del gradiente (F1-F6 y PG) se analizaron por inmunotransferencia utilizando anticuerpos específicos contra API y contra CPY.

10. Cvt19p no es esencial para la supervivencia a ayuno de nitrógeno

Cuando las células de levadura se someten a ayuno de algún nutriente como fuente de nitrógeno, de carbono o de fosfato, se desencadena el proceso de autofagia. En este proceso, porciones de citoplasma son englobadas al azar por estructuras de doble membrana que se cierran sobre sí mismas para dar lugar a los autofagosomas (Baba y col., 1994). Estos autofagosomas fusionan su membrana externa con la membrana de la vacuola liberando dentro de este orgánulo el cuerpo autofagocítico cuya membrana es degradada de forma dependiente de las proteasas vacuolares. El contenido de los autofagosomas es entonces hidrolizado por estas proteasas y utilizado como recurso en situaciones de carencia. Gracias a la autofagia las células de la levadura son, por lo tanto, capaces de sobrevivir a ayunos de fuente de nitrógeno, de carbono u otros nutrientes (Tsukada y Ohsumi, 1993). Consecuentemente, los mutantes en alguno de los

genes requeridos para el proceso de autofagia pierden viabilidad cuando se retira la fuente de nitrógeno del medio de cultivo. También es un fenotipo característico la imposibilidad de esporular de los diploides homocigotos para estas mutaciones.

Como el proceso de transporte de API y la autofagia comparten muchos componentes moleculares, la mayoría de los mutantes para el transporte de API a la vacuola también lo son para la autofagia (Harding y col., 1996; Scott y col., 1996). Quisimos por tanto determinar si las células $\Delta cvt19$ son sensibles al ayuno de fuente de nitrógeno. Para ello, células silvestres, interrumpidas en el gen *CVT19* o interrumpidas en el gen *APG12* (un gen esencial para el proceso autofágico) se incubaron en medio mínimo con glucosa y sin aminoácidos ni sulfato amónico (o cualquier otra fuente de nitrógeno) durante varios días. La supervivencia al ayuno se determinó tomando alícuotas de las células a distintos tiempos desde el inicio del ayuno, y determinando su capacidad de formar colonias en placas de medio rico YPD (Fig. 35). Tan solo las células capaces de llevar a cabo el proceso de autofagia, sobreviven y por tanto pueden formar colonias cuando se transfieren a un medio que permite el crecimiento. Las células silvestres BY4741 no perdieron viabilidad a lo largo de diez días de ayuno. Se observó también que las células $\Delta cvt19$ tenían una capacidad de supervivencia igual a la de las células silvestres. En cambio, las células $\Delta apg12$, incapaces de llevar a cabo el proceso de la autofagia, empezaban a perder su capacidad de formar colonias al cabo de los tres días de incubación en ausencia de fuente de nitrógeno, y después de

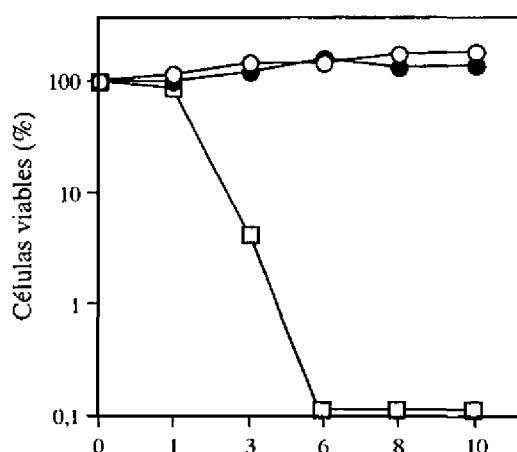


Fig. 35 Supervivencia a ayuno de nitrógeno de células $\Delta cvt19$. Células silvestres (representadas con círculos negros), $\Delta apg12$ (cuadrados) y $\Delta cvt19$ (círculos blancos) se cultivaron en medio SD, se lavaron con agua, se transfirieron a medio SD(-N) y se incubaron a 30°C. A los tiempos indicados se examinó la viabilidad de las células, como se describe en Materiales y Métodos. Los porcentajes de supervivencia representados están referidos al número de colonias aparecido en la muestra a tiempo cero de ayuno.

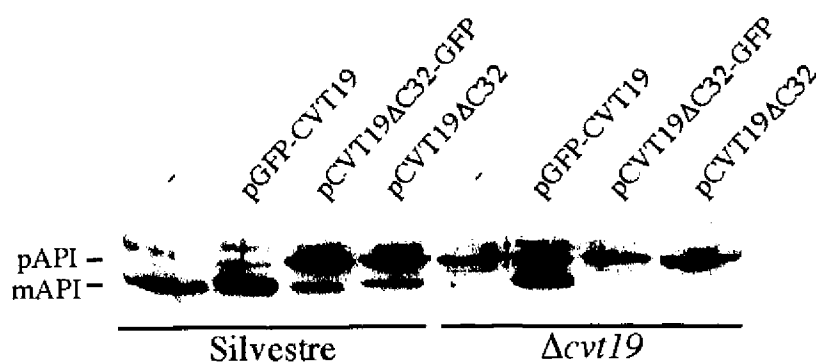


Fig. 37 Procesamiento de API en células transformadas con pGFP-CVT19, pCVT19ΔC32-GFP y pCVT19ΔC32. Células silvestres o $\Delta cvt19$ transformadas con pGFP-CVT19, pCVT19ΔC32-GFP o pCVT19ΔC32, o sin transformar, se cultivaron en medio SD hasta una densidad óptica de 1. Se prepararon extractos crudos y se analizó mediante inmunotransferencia, como se describe en Materiales y Métodos, el procesamiento de la proteína API en las distintas cepas.

habían sido incubadas durante dos horas en medio de ayuno de nitrógeno. En el fondo genético silvestre la fluorescencia se distribuye entre el citoplasma y, en gran parte de las células, en unas estructuras redondeadas localizadas también en el citoplasma. El número de estas estructuras es variable, siendo generalmente de entre una y cuatro por célula. En cambio, después de ayunar las células durante dos horas, la gran mayoría de estas estructuras dejaban de verse mientras que la fluorescencia citoplásmica permanecía invariable.

Las células $\Delta cvt19$ expresando esta fusión, mostraron un patrón de fluorescencia muy similar al de las células silvestres: en condiciones de crecimiento la fluorescencia se encontraba repartida entre el citoplasma y las estructuras redondeadas que, en este fondo, son más frecuentes (por número de células totales) y abundantes que en las células silvestres. Después del ayuno de dos horas, también en este caso la mayoría de las estructuras redondeadas dejaban de verse. Este patrón de localización similar al de las células silvestres, es consistente con el hecho de que esta construcción es capaz de complementar el fenotipo de las células $\Delta cvt19$.

Cuando se estudió la expresión de la fusión en las células $\Delta apg12$, fondo en el cual, y como se ha mencionado antes, la autofagia y el transporte de API están bloqueados, se observó como las estructuras redondeadas son mucho más abundantes que en células silvestres o células $\Delta cvt19$ y que la fluorescencia citosólica es más tenue. Tras el ayuno de dos horas en un medio sin fuente de nitrógeno, el patrón de fluorescencia que presentaban estas células era idéntico al que tenían en medio completo. Este resultado es coherente con el hecho de que Cvt19p viaja a la

vacuola y es degradada allí, según el trabajo del grupo de D. J. Klionsky (Scott y col., 2001) y de acuerdo con resultados obtenidos en nuestro laboratorio. Es decir, en el mutante $\Delta apg12$, con la ruta bloqueada, las estructuras que contienen Cvt19p permanecen inalterables aunque se induzca el ayuno, al contrario de lo que ocurre en células en las que la ruta de transporte de API es funcional.

El efecto del ayuno de fuente de nitrógeno sobre la distribución de la fluorescencia y su aparente dependencia de la funcionalidad de la ruta de transporte, nos llevó a preguntarnos qué ocurría en las células silvestres expresando la fusión Cvt19 Δ C32-GFP. En esta fusión la GFP se sitúa en el extremo carboxilo terminal de una versión mutante de Cvt19p en la que faltan los últimos 32 aminoácidos de la proteína. Esta fusión no es capaz de complementar el fenotipo de transporte de API en las células $\Delta cvt19$ (Fig. 37), e incluso impide el transporte pasivo a la vacuola, y por tanto el procesamiento lento de API, en condiciones de ayuno (Fig. 38). Es más, cuando esta fusión se expresa en el fondo silvestre el procesamiento de pAPI se bloquea, comportándose, por lo tanto, como un mutante dominante negativo (Fig. 37). El fenotipo observado al expresar esta proteína de fusión no se debe a la presencia de la GFP en el extremo

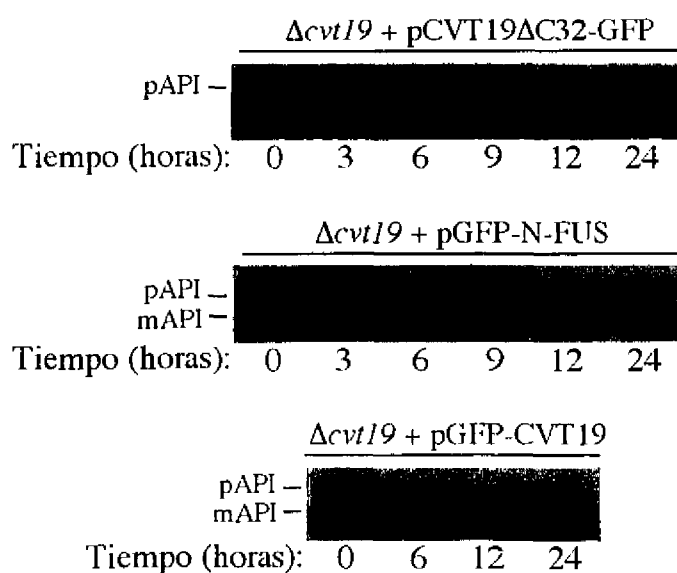


Fig. 38 Estudio del procesamiento de API tras largos períodos de ayuno de fuente de nitrógeno en células $\Delta cvt19$ transformadas con pCVT19 Δ C32-GFP. Células $\Delta cvt19$ transformadas con pCVT19 Δ C32-GFP, pGFP-N-FUS y pGFP-CVT19 cultivadas en medio SD, se lavaron con agua destilada y se transfirieron a medio SD(-N). A los tiempos indicados se tomaron muestras que fueron analizadas por inmunotransferencia para estudiar el procesamiento de API.

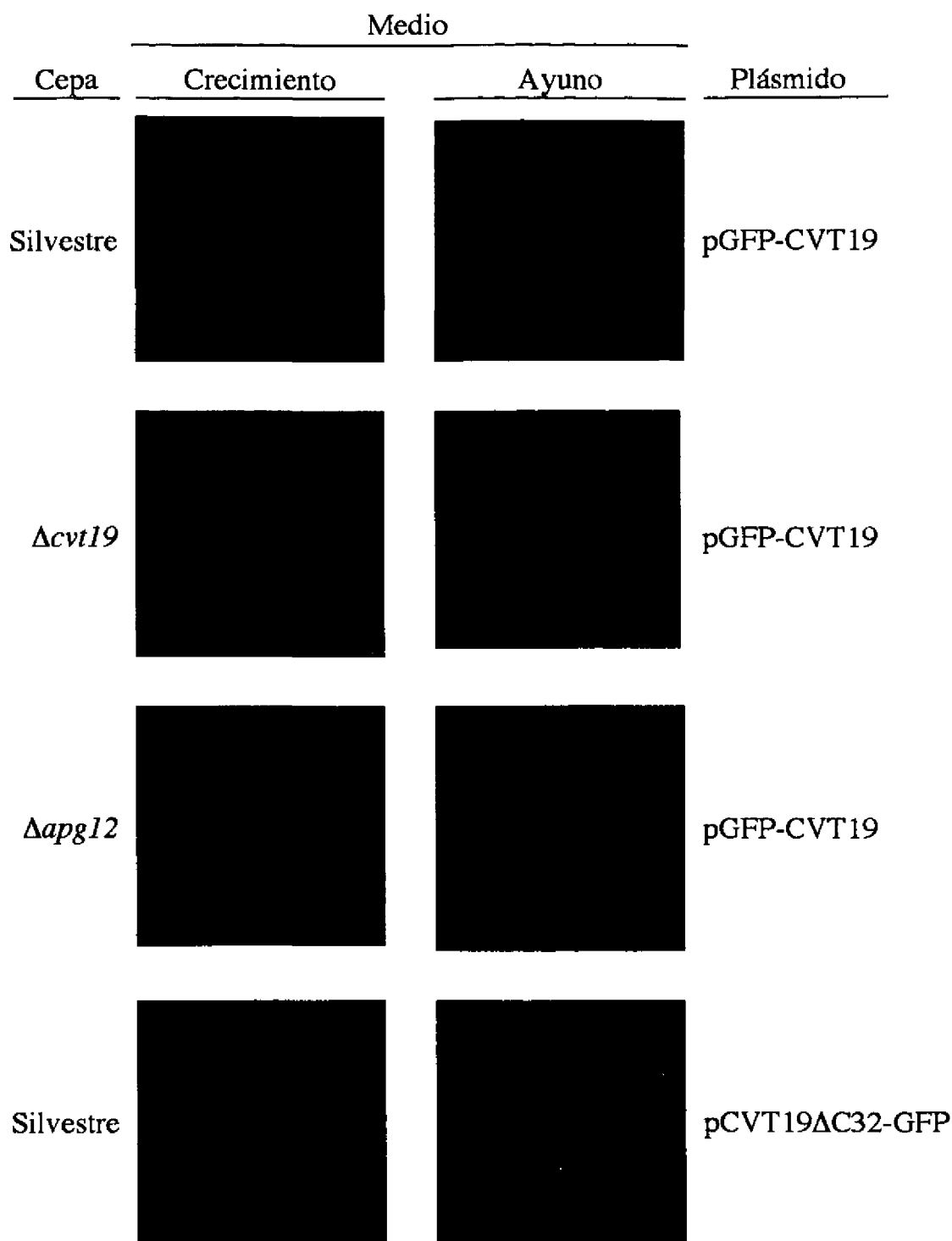


Fig. 39 Distribución celular de Cvt19p. En las imágenes de microscopía de fluorescencia se muestra la distribución de GFP-Cvt19p y Cvt19ΔC32-GFP expresadas en células silvestres, $\Delta apg12$ o $\Delta cvt19$. Las células se cultivaron en medio SD (condiciones vegetativas) y se transfirieron durante dos horas a medio (SD-N) (ayuno de nitrógeno), se recogieron y lavaron con PBS para su observación al microscopio.

carboxilo terminal ya que, en las células que expresaban Cvt19 Δ C32p, esta proteína también actuaba como dominante negativo (Fig. 37). Cuando se expresó la fusión Cvt19 Δ C32-GFP en las células silvestres se observó que toda la fluorescencia se concentraba en las estructuras redondeadas y no era apreciable la tinción en el citoplasma. Estas estructuras, de mayor tamaño que las formadas por la fusión GFP-Cvt19p, se encontraban en la mayoría de los casos en número de sólo una estructura por célula. Cuando estas células se sometieron a ayuno de fuente de nitrógeno durante dos horas, las estructuras permanecían inalteradas en el citoplasma. Este patrón de fluorescencia es parecido al que se da en el caso de las células Δ apg12 (ver arriba), en las que está bloqueado el importe de API a la vacuola y la ruta autofágica.

En estos Resultados se ha analizado el papel de dos proteínas, Ssa1p y Cvt19p, en el transporte de API a la vacuola de *Saccharomyces cerevisiae*. Como se ha mostrado mediante la combinación de técnicas bioquímicas y de biología molecular, ambas proteínas son necesarias en la ruta de transporte en un paso anterior a la formación de las vesículas transportadoras y posterior a la oligomerización de pAPI en dodecámeros.

Discusión

Discusión

1. Interés del estudio del transporte de API

El transporte de la aminopeptidasa I a la vacuola es un proceso complejo que todavía no se comprende en todos sus aspectos. Morfológicamente ofrece una gran similitud con el proceso de autofagia y comparte con esta ruta degradativa una serie de problemas conceptualmente interesantes y que resultan novedosos. Desde el punto de vista del mecanismo, uno de estos problemas, aún sin resolver, es el origen de la membrana que da lugar a las vesículas y la manera en que se deforma para cerrarse y formar la vesícula secuestrando la carga adecuada. Desde el punto de vista de señalización, otro de los interrogantes que permanece abierto es cómo percibe la maquinaria subcelular las señales ambientales que determinan el tránsito entre la ruta biosintética y la degradativa y la selección de las distintas cargas en ambas situaciones. Por último, la pregunta estrechamente relacionada con las anteriores, de cómo se consigue la especificidad en el transporte de API quizá pueda empezar a responderse a partir de la detección de Cvt19p como una proteína necesaria para la carga selectiva de la aminopeptidasa en las vesículas transportadoras (revisado en Subramani, 2001). Un aspecto que distingue esta ruta alternativa de transporte a la vacuola es el hecho de que en el transporte de la aminopeptidasa no existe reparto o distribución de proteínas en el sentido de que sólo se producen dos tipos de vesículas, vesículas cvt o autofagosomas, que no coexisten en la célula y que, en cualquier caso, ambas van a fusionarse con un solo orgánulo, la vacuola. En la ruta secretora, las proteínas deben tener en su secuencia aminoacídica señales para permanecer en un orgánulo o viajar al siguiente de la ruta, y señales para su distribución desde el aparato de Golgi al endosoma, a la membrana plasmática o, en el caso de la ruta de la fosfatasa alcalina, directamente a la

vacuola (Donaldson y Lippincott-Schwartz, 2000). En el caso de API la proteína ha de ser reconocida por su receptor que está en la prevesícula o la dirige hacia ella. Según las condiciones metabólicas en las que se encuentre la célula, la pre-vesícula dará lugar a una vesícula cvt o a un autofagosoma que transportará la aminopeptidasa a la vacuola. El esclarecimiento de los mecanismos de transporte de API puede ayudar a la comprensión de los sistemas clásicos de transporte y distribución intracelular de proteínas ofreciendo información sobre la función de elementos comunes presentes en la ruta secretora y la de transporte de API. Un ejemplo de lo anterior son las quinasas de fosfoinosítidos. Vps34p es una fosfatidil inositol 3 quinasa que se requiere para el transporte de proteínas desde el aparato de Golgi al endosoma en la ruta secretora (Kihara y col., 2001) y que también es necesaria en la ruta de API y en la autofagia. No se conoce cuál es la función de la fosforilación de estos lípidos de membrana en ninguno de los tres casos pero quizá el descubrimiento de la función en el transporte de API, probablemente más sencillo de dilucidar, puede aproximarnos mucho a su función dentro de la ruta secretora.

Como se ha explicado en la introducción, la mayoría de los genes necesarios para el transporte de API también lo son para el proceso de autofagia (Harding y col., 1995; Scott y col., 1996). Este solapamiento refleja el hecho de que ambos procesos son mecánicamente muy parecidos. En condiciones de ayuno de fuente de nitrógeno, una ruta degradativa e inespecífica en la captura del material citosólico como es la ruta autofágica es capaz de capturar y transportar específicamente una proteína residente en la vacuola. Una consecuencia de esto es que se ha venido utilizando la ruta cvt como modelo para el estudio de la autofagia. La aminopeptidasa I sirve como marcador del proceso: un mutante en el que no haya procesamiento de pAPI es un potencial candidato a ser un mutante de autofagia, aunque este extremo haya de ser siempre confirmado. Muy recientemente se ha publicado un interesante trabajo (Ishihara y col., 2001) en que se aborda sistemáticamente la distinción entre aquellos genes de la ruta transportadora que son necesarios sólo para la ruta cvt o sólo para la autofagia.

La autofagia en células de mamífero es un proceso que presenta multitud de paralelismos con la de *Saccharomyces cerevisiae* (Dunn y col., 1990a; Dunn y col., 1990b; Baba y col., 1994). Este hecho, aparente también cuando se estudia morfológicamente el proceso en ambos sistemas, se pone de manifiesto al comprobar que muchos de los genes requeridos para la autofagia en levadura tienen homólogos en células de mamífero y que en estos organismos también son necesarios para el mismo proceso (Klionsky y Emr, 2000;

Abeliovich y Klionsky, 2001). Es más, procesos como el de modificación de Apg12p están presentes en células de mamífero y son necesarios para la autofagia (Mizushima y col., 1998a). Por lo tanto el conocimiento adquirido acerca de la autofagia en levadura puede ampliar el existente sobre el mismo proceso en mamíferos.

De lo dicho anteriormente se deriva que el conocimiento acerca de la autofagia, y de la ruta cvt, contribuirá al estudio de algunas enfermedades humanas. Se ha propuesto que la autofagia en, al menos, algunos tejidos es necesaria para los procesos de muerte celular programada (Schwartz y col., 1993; Bursch y col., 2000; Hammond y col., 1998; Jia y col., 1997). Esto es un reflejo de la importancia de la regulación del proceso por parte del organismo. Efectivamente, parece que en células de mamífero se puede establecer una relación entre una excesiva actividad autofagocítica y la aparición de trastornos neurodegenerativos como la enfermedad de Parkinson (Anglade y col. 1997). Paralelamente, similar asociación se establece entre un defecto en la autofagia y la propensión a la formación de tumores (Liang y col., 1999).

2. Búsqueda de proteínas que interaccionan con API

Para tratar de comprender y describir a nivel molecular los mecanismos por los que tiene lugar un determinado proceso celular es necesario buscar proteínas que estén implicadas en él. En el caso del transporte de la aminopeptidasa I a la vacuola de *Saccharomyces cerevisiae* se han utilizado las estrategias clásicas, genética y bioquímica, para la identificación de componentes y la caracterización del proceso. Así por ejemplo se llevaron a cabo mutagénesis para tratar de identificar mutantes que acumularan la forma precursora de la proteína (Harding y col., 1995). En otros casos, se buscaron mutantes afectados en autofagia, por ejemplo por pérdida de viabilidad a tiempos largos en ayuno de fuente de nitrógeno (Tsukada y Ohsumi, 1993), la mayoría de los cuales suelen ser incapaces de transportar API a la vacuola. Estos abordajes dieron como resultado la obtención de un gran número de mutantes y muchos de los genes responsables ya han sido clonados. Sin embargo la alta redundancia funcional que existe en el genoma de la levadura hace posible que existan genes implicados en el proceso que se estudia, cuyas mutaciones no den el fenotipo que se busca. También puede ocurrir que la mutación de alguno de los genes necesarios para el proceso sea letal. Estas limitaciones metodológicas permiten llegar a la conclusión de que todavía han de identificarse más genes necesarios para el transporte de API a la vacuola.

Para buscar genes implicados en esta ruta de transporte, eludiendo en lo posible estos problemas decidimos buscar genes cuyos productos interaccionaran con API y posteriormente estudiar su potencial implicación en el proceso de transporte de API. Nuestro abordaje se basó en que el prepro-péptido de API es necesario para conducir API a la vacuola y presumiblemente debe interaccionar con algún componente de la maquinaria de transporte. En la búsqueda se utilizaron dos planteamientos experimentales: en el primero, *in vitro*, buscamos proteínas que fueran retenidas por el péptido amino terminal de API, necesario para el transporte de esta a la vacuola, inmovilizado en una resina de agarosa. De este modo detectamos Ssalp y confirmamos *in vivo*, mediante el uso de un mutante termosensible, su implicación funcional en el transporte de la aminopeptidasa. El segundo modo de acercarnos al problema consistió en la clonación de distintas regiones del gen que codifica API en el plásmido cebo del sistema de dos híbridos, y la búsqueda de proteínas que interaccionaran utilizando una genoteca en el plásmido pACT2. Así se detectó la interacción con el producto génico del gen *YHR188c*, de función desconocida, y cuya delección es letal. Las dificultades intrínsecas del estudio de un gen esencial unido al creciente interés en la función del gen *CVT19*, detectado también en un estudio de dos híbridos, hicieron que nos concentráramos en el estudio de este último.

Los abordajes masivos que se están llevando a cabo con el conjunto de proteínas derivadas del genoma de la levadura, lo que se ha dado en llamar últimamente proteoma, están suponiendo un salto cualitativo para el estudio de la biología celular de *Saccharomyces cerevisiae*, y de otras células eucariotas, por extensión. Estos abordajes han sido posibles gracias al esfuerzo llevado a cabo para secuenciar todo el genoma de la levadura. Estudios masivos de dos híbridos y el estudio de los componentes de los complejos proteicos nativos aislados de la levadura permiten configurar verdaderos mapas de interacciones entre proteínas, de evidente utilidad. Desde luego esta gran cantidad de datos debe ser considerada con suma precaución ya que muchas de las interacciones detectadas en estos abordajes pueden ser artefactuales o inespecíficas. Por ello la información que se obtiene debe considerarse únicamente como orientativa y debe confirmarse aún en el caso de interacciones detectadas entre proteínas que participen en los mismos procesos o que tengan motivos de secuencia que puedan explicar de alguna manera la relación funcional. Como se ha mostrado en Resultados, la interacción detectada entre API y Cvt19p en el trabajo de Uetz y col. (2000) se confirmó en el laboratorio y se estudió el comportamiento de un mutante nulo en el gen ya que no se conocía nada sobre esta proteína. Gracias al estudio de nuevas interacciones con API, y

también con Cvt19p, podrían detectarse otras proteínas de la levadura necesarias para el transporte de API a la vacuola. La confirmación de estas nuevas interacciones y el establecimiento definitivo de cuáles son las proteínas que interactúan entre sí en este proceso puede llevar a revelar las claves para el entendimiento de la ruta.

La estrategia de búsqueda de proteínas que físicamente interactuaran con API elegida para nuestro estudio, selecciona, en principio, proteínas implicadas en las primeras etapas de la ruta que lleva a API a la vacuola, antes de la formación de las vesículas transportadoras. Es de esperar que una proteína que interactúa con el precursor de API lo hará antes de la formación de las vesículas y puede ser un receptor en la membrana de la pre-vesícula, un transportador de la proteína desde el citoplasma hacia la membrana o algún tipo de proteína que presente o prepare a la hidrolasa para la interacción con alguno de los anteriores. Por el contrario parece más difícil concebir que se pudieran encontrar proteínas implicadas en la formación de las vesículas y que sean capaces de interactuar directamente con API, aunque esto no deje de estar dentro de lo posible. Existe un problema sin embargo, inherente a la estrategia utilizada, y es el hecho de que potencialmente se pueden detectar interacciones enzima-sustrato entre API y proteínas que van a la vacuola para ser degradadas. En el caso de Cvt19p fue significativo que la interacción con el precursor de API fuera mucho más fuerte que con la proteína madura. Esto nos sugería, al inicio de su estudio, que la proteína Cvt19p podría estar implicada en la ruta transportadora.

3. Función de Ssa1p en el transporte de API a la vacuola

A tenor de los resultados mostrados en esta memoria sobre la relación entre API y Ssa1p parecen confirmarse las predicciones previas al estudio: la chaperona es necesaria para el transporte de la aminopeptidasa e interviene en una etapa temprana de la ruta.

Se han descrito en células eucariotas multitud de funciones en las que participan chaperonas de esta familia (Bukau y Horwich, 1998), entre las más importantes podemos citar:

- 1) Asistir al correcto plegamiento de las nuevas proteínas que emergen del ribosoma.
- 2) Permitir la entrada o translocación, estabilizando la proteína desplegada, en orgánulos como la mitocondria o el retículo endoplásmico a través de los sistemas de transporte proteicos o translocones.
- 3) Asistir al correcto plegamiento de las nuevas proteínas que entran en un orgánulo con una conformación desplegada.

- 4) Evitar la agregación de las proteínas que se puede producir en condiciones de estrés térmico y favorecer el plegamiento correcto de proteínas mal plegadas.
- 5) Desensamblaje de oligómeros proteicos.
- 6) Ensamblaje de oligómeros proteicos.

En cuanto al estadio de la ruta de transporte de API en que actúa la proteína de estrés Ssa1p, los datos experimentales de la movilidad de la aminopeptidasa en gradientes de glicerol, en la cepa control y la termosensible, sitúan dicha acción en un punto posterior a la formación de los dodecámeros. Este hecho parece descartar la posibilidad de que Ssa1p actúe favoreciendo el plegamiento de API mientras es sintetizada. Es más, después de su síntesis a la temperatura restrictiva, API no es degradada sino que, al transferir las células a la temperatura permisiva, es transportada a la vacuola y procesada. Esto es coherente con lo que se ha descrito acerca del plegamiento de proteínas nacientes en levadura. En efecto, se ha asignado el papel de asistir este tipo de plegamiento a las chaperonas citosólicas de 70 KDa Ssb1 y Ssb2, proteínas alejadas evolutivamente, en términos relativos, de las proteínas Ssa (Nelson y col., 1992; Pfund y col., 1998). Se puede deducir también que el prepro-péptido debe quedar expuesto en la superficie de los dodecámeros de manera que Ssa1p pueda interactuar con él.

Para llevar a cabo cualquiera de las funciones que hemos enumerado más arriba, las proteínas de estrés han de unirse a sus proteínas sustrato, estabilizándolas cuando se encuentran en una conformación total o parcialmente desplegada. La unión, no covalente, se produce generalmente con regiones de carácter hidrofóbico que exponen las proteínas sustrato.

Después de demostrar que la región amino terminal de API es capaz de interactuar *in vitro* con la chaperona investigamos si esta reconoce algún motivo contenido en la estructura primaria o secundaria del prepro-péptido. Para ello se estudió la interacción de la chaperona con un péptido unido a la resina que contenía una mutación en la posición 7 (I7G), que impide el transporte de pAPI a la vacuola y altera la estructura en α -hélice de esta región. Los resultados obtenidos mostraron que la sustitución de la isoleucina por una glicina no impedía la interacción, es decir, que la especificidad en el reconocimiento entre ambas proteínas no se ve afectada por la alteración de la estructura secundaria que introduce la mutación. Otra alternativa es que la interacción entre Ssa1p y la región aminoterminal de API se produjera a través de la segunda α -hélice de esta última. En cualquier caso y dado que la mutación I7G impide el transporte a la vacuola de API, pero no la interacción del extremo

amino terminal con Ssa1p se puede postular que existieran, al menos, dos pasos necesarios para poder progresar en la ruta que dirige la aminopeptidasa a la vacuola. Uno sería la interacción de la extensión aminoterminal con las chaperonas citosólicas. El segundo, que ocurriría posteriormente, consistiría en el reconocimiento de dicha extensión por un receptor, quizá Cvt19p (ver más abajo) que determinaría la especificidad del proceso y distinguiría entre la secuencia silvestre y los mutantes puntuales.

Los experimentos de protección a proteasas *in vitro* en la cepa al^{ts}a234 muestran claramente que, en ausencia de una chaperona funcional, pAPI está desprotegida del ataque proteolítico, indicando que el paso bloqueado en el mutante termosensible, a la temperatura restrictiva, es anterior al encerramiento de pAPI en una vesícula. Por lo tanto la acción de la chaperona se sitúa en el citoplasma y en un paso posterior a la formación de los dodecámeros.

4. Función de Cvt19p en el transporte de API a la vacuola

La segunda parte del trabajo que se presenta en esta Tesis trata del estudio de la función de la proteína Cvt19p en el transporte de la aminopeptidasa I a la vacuola. Cvt19p interacciona con API, como se puso de manifiesto en un estudio masivo de dos híbridos (Uetz y col., 2000). La interacción fue confirmada en nuestro laboratorio utilizando la misma aproximación. Como se muestra en los Resultados y se discute más abajo, la demostración de que Cvt19p es necesaria para el transporte de la aminopeptidasa I a la vacuola, tanto en condiciones de crecimiento como tras períodos cortos de ayuno confirmó, la relevancia fisiológica de la interacción entre las dos proteínas.

CVT19 es un gen no esencial en levadura y su producto génico no tiene dominios conocidos ni muestra homología con proteínas de ningún otro organismo. De su secuencia aminoacídica no se puede obtener más información que la de su homología con el producto de *YOL083w*, también de *Saccharomyces cerevisiae* (31% de homología y 49% de identidad), gen contiguo a *CVT19* en el cromosoma XV y que no ofrece, en principio, información adicional ya que no se conoce nada acerca de su función. Es de destacar que la homología entre ambas proteínas, Cvt19p y Yol083p, es mayor en la zona carboxilo terminal, necesaria para la funcionalidad de Cvt19p, que incluye una secuencia de 8 aminoácidos conservada en las dos proteínas. Esta secuencia también se encuentra conservada en otras tres proteínas que son necesarias para la autofagia, Apg6p, Apg12p y Aut10p, esta última de función desconocida pero necesaria para la formación de las vesículas cvt y autofagosomas (Barth y

col., 2001; Guan y col., 2001). Por el momento desconocemos si la conservación de esta secuencia en otras proteínas de la ruta tiene implicaciones funcionales.

Los resultados obtenidos mediante el sistema de dos híbridos revelan claramente la importancia de la extensión amino terminal para la interacción de Cvt19p con la aminopeptidasa. El hecho de que Cvt19p sea capaz de interactuar en el ensayo de dos híbridos, no solo con pAPI, sino también con mAPI aunque más débilmente, y no muestre interacción con el prepro-péptido es interesante y merece discutirse, sobre todo teniendo en cuenta el papel relevante de la extensión amino terminal en el proceso de transporte de API. En primer lugar, estos datos sugieren la necesidad de determinantes adicionales contenidos en mAPI para la interacción entre ambas proteínas. El estudio de la interacción de Cvt19p con distintas deleciones carboxilo terminales de API confirman esta observación, ya que la ausencia de la mitad de la proteína (resultado no mostrado) así como la de sólo 100 residuos eliminan totalmente la interacción. La importancia de la parte madura para la interacción es en cierto modo sorprendente si se tiene en cuenta que la fusión del prepro-péptido a la proteína verde fluorescente, es decir, una proteína quimérica en la que no está presente la zona madura de API, es capaz de viajar a la vacuola. Esta aparente contradicción se podría explicar de dos maneras. La primera posibilidad es que preproGFP viaje a la vacuola por una ruta total o parcialmente diferente de la ruta cvt, aunque esto parece poco probable ya que el transporte a la vacuola de esta proteína quimérica está impedido, como el de pAPI, por mutaciones en la región prepro (Martínez y col., 1999). Otra posibilidad es que la interacción de la parte madura de API con Cvt19p no sea estrictamente necesaria para el transporte aunque pueda favorecerlo.

El hecho de que la extensión aminoterminal no interactúe por sí sola con Cvt19p se puede interpretar como que la conformación que adopta el prepro-péptido cuando forma parte de la proteína híbrida hace que esté de alguna manera apantallado por el dominio de Gal4p de manera que no sea accesible para Cvt19p.

En su trabajo sobre Cvt19p (Scott y col., 2001) los autores realizaron un estudio de co-precipitación entre API y Cvt19p en el que se demostraba que la deleción de los aminoácidos 9 a 11 en la región prepro de API, que impide su asociación con la fracción de membranas, así como su transporte a la vacuola, conduce a una interacción muy débil con Cvt19p. Sin embargo una aminopeptidasa portadora de la mutación P22L, también incapaz de viajar a la vacuola, sí permite la asociación con las membranas (Oda y col., 1996) y también la interacción entre ambas proteínas. Estos resultados del grupo de D. J. Klionsky utilizando

experimentos de coimmunoprecipitación son coherentes con el dato obtenido en nuestro laboratorio con el ensayo de dos híbridos, que indican la importancia de la extensión amino terminal de API para su interacción con Cvt19p. Pero dichos resultados aportan además otro dato interesante: Cvt19p parece incapaz de coprecipitar con una aminopeptidasa precursora portadora de una delección, $\Delta[9-11]$, que rompe la estructura en α -hélice de la región pre- de pAPI, pero, sin embargo, la mutación P22L que rompe la estructura secundaria del giro β entre las dos α -hélices (Oda y col., 1996), no elimina ni disminuye la interacción entre pAPI[P22L] y Cvt19p. Esta observación sugiere que, como habíamos propuesto anteriormente en esta Discusión, Cvt19p sería capaz de discriminar en contra de una forma de aminopeptidasa que tiene una alteración en la estructura secundaria de la parte pre- de la extensión amino terminal, de tal modo que la interacción entre ambas proteínas no se produciría determinando la falta de transporte de pAPI[$\Delta 9-11$]. Esta discriminación, en cambio, no tendría lugar cuando la mutación no modifica la estructura en α -hélice de la presecuencia, como ocurre en pAPI[P22L], hecho que estaría de acuerdo con datos anteriores en la literatura que indican una mayor permisividad para los cambios en la segunda parte del prepro-péptido. Existe sin embargo otra posible interpretación que nos parece importante discutir: la interacción que se detecta entre API y Cvt19p en experimentos de inmunoprecipitación sería posible únicamente cuando el precursor y Cvt19p han sido reclutadas a la membrana (recordemos que API[P22L] interacciona fuertemente con membranas mientras que API[$\Delta 9-11$] es incapaz de hacerlo). En ese caso Cvt19p tendría entre sus funciones la de estabilizar la interacción de pAPI con la maquinaria transportadora y la falta de coprecipitación de Cvt19p con API[$\Delta 9-11$] se debería a que esta última no está localizada adecuadamente. Esta interpretación no está en contradicción con la demostración de que ambas proteínas, Cvt19p y API, interaccionen directamente en experimentos de dos híbridos, y no necesiten una proteína puente en experimentos de unión *in vitro*, pero sí modifica en cierto modo la función de receptor propuesta para Cvt19p (Scott y col., 2001), ya que ésta no sería capaz de distinguir las formas mutantes de pAPI, que se sabe que impiden el transporte a la vacuola, sino que interaccionaría con API siempre que esta fuera capaz de asociarse a las membranas. Se trasladaría, por tanto, la capacidad de discriminar, a otra proteína que sería el auténtico receptor de pAPI. Es necesaria la identificación de más componentes de esta etapa del transporte para poder distinguir entre estas posibles interpretaciones.

La relevancia fisiológica de la asociación entre API y Cvt19p se puso de manifiesto al demostrar la necesidad de Cvt19p para el transporte de la aminopeptidasa. Tanto en condiciones de crecimiento como de ausencia de fuente de nitrógeno, el transporte y procesamiento de API es totalmente dependiente de Cvt19p. Nos preguntamos entonces si el proceso de autofagia estaba afectado en un mutante $\Delta cvt19$. Mediante varios criterios demostramos que la autofagia funciona en ausencia de Cvt19p. En efecto, la supervivencia del mutante $\Delta cvt19$ en condiciones de ayuno es indistinguible de la que muestra una cepa silvestre, los cuerpos autofágicos se pueden observar en el interior de la vacuola cuando las células se ayunan en presencia de PMSF, agente que inhibe la acción de la proteasa B necesaria para la degradación de los mismos (resultado no mostrado) y, por último, un diploide homocigoto para la mutación $\Delta cvt19$ es capaz de esporular (resultado no mostrado). Todas estas funciones están alteradas en mutantes incapaces de llevar a cabo el proceso de autofagia (Tsukada y Ohsumi, 1993). Es interesante destacar el hecho de que, a tiempos largos de incubación en medio de ayuno, se observara el procesamiento de una fracción de pAPI. Esto nos permite sugerir que API puede viajar a la vacuola inespecíficamente por autofagia siendo transportada de manera pasiva con la larga vida media característica de las proteínas citoplasmáticas que son secuestradas al azar. Este fenotipo contrasta con el de otros mutantes en genes CVT que, al ser transferidos a medio sin fuente de nitrógeno, recuperan de inmediato la capacidad de transporte selectivo de API. Estos genes, como Cvt3p o Vac8p (Abeliovich y col., 2000), podrían ser componentes exclusivamente del sistema de transporte de API en condiciones vegetativas o ser proteínas señalizadoras para el desencadenamiento de la ruta cvt. Nuestra interpretación de todos estos datos es que en un mutante $\Delta cvt19$ la maquinaria de formación de los autofagosomas permanece, probablemente, intacta pero está afectado el mecanismo que lleva API selectivamente hacia el sitio de formación del autofagosoma. En el caso de las vesículas cvt, desconocemos si pueden formarse en ausencia de Cvt19p.

El defecto observado en la cepa mutante $\Delta cvt19$ puede, por lo que acabamos de comentar, deberse a una débil interacción de API con las vesículas de transporte. Esta hipótesis es compatible con los resultados que muestran que solo una fracción de API es capaz de asociarse a membranas en la cepa mutante, y que pAPI no está protegida de la acción de la proteinasa K en un ensayo *in vitro*. Además, cuando estas células estaban transformadas con un plásmido que expresa la fusión de Cvt19p a GFP, API se asociaba a membrana con la misma eficiencia que las células silvestres. Considerando que la formación

de los dodecámeros en el fondo mutante $\Delta cvt19$ no está afectada, podemos situar la función de Cvt19p en un punto posterior a la oligomerización y anterior a la interacción de pAPI con la membrana transportadora.

Los estudios de fluorescencia muestran la distribución de la proteína híbrida GFP-Cvt19p entre el citoplasma y unas estructuras redondeadas, de un tamaño aproximado de 130 a 250 nm, situadas generalmente en la proximidad de la vacuola y no en el lumen vacuolar. Esta distribución entre ambas localizaciones se altera drásticamente cuando se establece la autofagia de modo que, cuando se observan las células tras dos horas de ayuno, la fluorescencia está mayoritariamente en el citoplasma y es difícil encontrar estructuras como las que se ven en células vegetativas: o bien no se detectan o bien se ven muchas por célula pero más pequeñas. Este hecho puede indicar que las estructuras tal como las hemos definido más arriba, redondeadas y perivacuolares, han de reorganizarse en esas condiciones.

En cuanto la relación entre Cvt19p con la funcionalidad de la ruta es importante destacar, en primer lugar, que existen datos experimentales que demuestran, mediante experimentos de pulso y caza de Cvt19p (Scott y col., 2001), que Cvt19p viaja a la vacuola junto con pAPI y es degradada allí, tanto en condiciones de crecimiento como de ayuno. Por otro lado, datos obtenidos en nuestro laboratorio utilizando microscopía de fluorescencia de la proteína funcional GFP-Cvt19p apuntan en la misma dirección, ya que en una cepa $\Delta pep4$, con degradación vacuolar impedida, se detectan las estructuras que contienen GFP-Cvt19p en el interior de la vacuola. Cvt19p sería por tanto un receptor atípico, en el sentido de que viaja con su carga en lugar de ser reciclado. En segundo lugar, es interesante destacar el comportamiento de la proteína truncada Cvt19 Δ C32p que, como hemos mostrado en Resultados, funciona como un mutante dominante negativo. La distribución de la fluorescencia en las células que expresan esta forma mutante, funcionalmente inactiva para transportar API en crecimiento o en ayuno, muestra una total desaparición de la tinción citoplásmica y un incremento en el tamaño de las estructuras, además, estas estructuras no se reorganizan en respuesta a las condiciones de ayuno. En células $\Delta apg12$, que tampoco son capaces de transportar API a la vacuola en ninguna condición metabólica, las estructuras son visibles en todas las células y permanecen inalteradas al ser transferidas a medio sin fuente de nitrógeno, es decir, en estas células también el bloqueo de la ruta va acompañado de la estabilización de las estructuras.

Tomados en conjunto, todos estos datos sugieren que, en una cepa silvestre, con las dos rutas de transporte de API funcionales, tanto Cvt19p como API son incorporadas a

vesículas transportadoras, sean vesículas cvt o autofagosomas, y las dos proteínas alcanzan la vacuola donde Cvt19p es degradada y pAPI procesada. Por el contrario, en cepas con la ruta interrumpida, como es el caso de células portadoras de la proteína truncada Cvt19 Δ C32p, o de células que no pueden formar las vesículas, como el mutante Δ apg12, API y, muy probablemente, Cvt19p no pueden alcanzar la vacuola, y, en esta situación de interrupción de la ruta, las estructuras permanecen estables aunque se induzca la autofagia.

Aunque no tenemos evidencia directa, nuestros datos sugieren que la organización de Cvt19p en las estructuras puede ser un paso intermedio en el transporte de API a la vacuola por la ruta cvt. El establecimiento de las condiciones de ayuno determina un cambio cualitativo (se produce un tipo distinto de vesículas, los autofagosomas, que, además de API, captan componentes citosólicos de forma no selectiva) y también cuantitativo, puesto que el sistema de transporte tiene que acomodarse al gran aumento de API, cuya síntesis se incrementa 20 veces sin que el tiempo medio de su importe a la vacuola se vea alterado (Scott y col., 1996). Es posible que el necesario cambio en el sistema transportador requiera la reorganización de las estructuras que observamos en condiciones de ayuno.

Como se muestra en Resultados, la expresión de Cvt19 Δ C32p impide el transporte de API a la vacuola, incluso después de largos períodos de ayuno de nitrógeno. Esto parece significar que el binomio Cvt19 Δ C32p-API (capaces de interactuar entre sí como hemos mostrado en Resultados) no puede ser transportado a la vacuola en estas condiciones, a pesar de que la autofagia no se ve afectada en estas células. Tal vez esta forma truncada no tiene el determinante necesario para ir a la vacuola, lo cual implicaría que existe al menos un cierto grado de especificidad en el transporte autofágico, o quizá que la forma truncada está retenida irreversiblemente y es incapaz de ir a la vacuola.

El comportamiento de la forma dominante negativa de la proteína Cvt19 Δ C32p ofrece potencialmente una herramienta muy interesante para el estudio del mecanismo de transporte y puede contribuir a entender el papel de Cvt19p. La interacción en ensayo de dos híbridos entre Cvt19 Δ C32p y API proporciona una explicación en primera instancia del comportamiento de la forma truncada como dominante negativo. La capacidad de interacción con la aminopeptidasa junto a la imposibilidad de continuar su función en el transporte, pueden convertir esta forma de Cvt19p en una proteína "secuestradora" de API.

Los datos obtenidos en esta Tesis no permiten aclarar cuál es el defecto funcional de Cvt19p cuando se eliminan 32 residuos de su extremo carboxilo terminal. Se pueden proponer dos modelos:

1. la falta de esta región impediría la interacción con el/los componentes de la maquinaria necesarios para incorporar API y la propia Cvt19p a las vesículas transportadoras.
2. la proteína troncada interaccionaría de forma irreversible con algún elemento de la maquinaria de transporte bloqueando la ruta, bien porque adquiriera una conformación aberrante, o porque Cvt19 Δ C32p no pudiera recibir una señal (modificación covalente, interacción con otra proteína,...) que hiciera, en la proteína silvestre, transitoria la interacción con dicho elemento.

Ambos modelos serían compatibles con el crecimiento exagerado de las estructuras que se convertirían en un "callejón sin salida". La búsqueda de proteínas que interaccionen con Cvt19p puede ayudar a distinguir entre estas dos posibilidades.

En el futuro será necesario establecer precisamente cómo opera Cvt19p, cuál es su función bioquímica y qué otros elementos son necesarios para seleccionar API y cargarla en las vesículas transportadoras.

Conclusiones

Conclusiones

1. Ssa1p, chaperona citosólica de la familia de las Hsp70, interacciona con el extremo amino terminal de pAPI e interviene en su transporte a la vacuola, en una etapa posterior a la oligomerización y anterior a su inclusión en las vesículas transportadoras.
2. Cvt19p es necesaria para el transporte de API a la vacuola tanto en condiciones de crecimiento como en condiciones de ayuno, pero no es necesaria para el proceso de autofagia.
3. Cvt19p es requerida para dirigir el oligómero de API a las vesículas cvt o a los autofagosomas.
4. Cvt19p se organiza en unas estructuras citoplásmicas perivacuolares que, probablemente, constituyen una etapa intermedia en el transporte de API a la vacuola.

Bibliografía

Bibliografía

- Abeliovich H, Darsow T, y Emr SD. (1999) Cytoplasm to vacuole trafficking of aminopeptidase I requires a t-SNARE-Sec1p complex composed of Tlg2p and Vps45p. *EMBO J.* **18**, 6005-6016.
- Abeliovich, H., Dunn, W.A., Jr., Kim, J. y Klionsky, D.J. (2000) Dissection of autophagosome biogenesis into distinct nucleation and expansion steps. *J Cell Biol*, **151**, 1025-1034.
- Abeliovich, H. y Klionsky, D.J. (2001) Autophagy in yeast: mechanistic insights and physiological function. *Microbiol Mol Biol Rev*, **65**, 463-479.
- Adams, A., Gottschling, D. E., Kaiser, C. A., and Stearns, T. (1997). *Methods in Yeast Genetics: 123-127*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY
- Aebersold, R.H., Leavitt, J., Saavedra, R.A., Hood, L.E. y Kent, S.B. (1987) Internal amino acid sequence analysis of proteins separated by one- or two-dimensional gel electrophoresis after in situ protease digestion on nitrocellulose. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **84**, 6970-6974.
- Anglade, P., Vyas, S., Javoy-Agid, F., Herrero, M.T., Michel, P.P., Marquez, J., Mouatt-Prigent, A., Ruberg, M., Hirsch, E.C. y Agid, Y. (1997) Apoptosis and autophagy in nigral neurons of patients with Parkinson's disease. *Histol Histopathol*, **12**, 25-31.
- Aplin, A., Jasionowski, T., Tuttle, D.L., Lenk, S.E. y Dunn, W.A., Jr. (1992) Cytoskeletal elements are required for the formation and maturation of autophagic vacuoles. *J Cell Physiol*, **152**, 458-466.
- Baba, M., Takeshige, K., Baba, N. y Ohsumi, Y. (1994) Ultrastructural analysis of the autophagic process in yeast: detection of autophagosomes and their characterization. *J Cell Biol*, **124**, 903-913.
- Baba, M., Osumi, M., Scott, S.V., Klionsky, D.J. y Ohsumi, Y. (1997) Two distinct pathways for targeting proteins from the cytoplasm to the vacuole/lysosome. *J Cell Biol*, **139**, 1687-1695.
- Barth, H., Meiling-Wesse, K., Epple, U.D. y Thumm, M. (2001) Autophagy and the cytoplasm to vacuole targeting pathway both require Aut10p. *FEBS Lett*, **508**, 23-28.
- Becker, J., Walter, W., Yan, W. y Craig, E.A. (1996) Functional interaction of cytosolic hsp70 and a DnaJ-related protein, Ydj1p, in protein translocation in vivo. *Mol Cell Biol*, **16**, 4378-4386.
- Blobel, G. y Dobberstein, B. (1975) Transfer to proteins across membranes. II. Reconstitution of functional rough microsomes from heterologous components. *J Cell Biol*, **67**, 852-862.
- Bonifacino, J.S. y Weissman, A.M. (1998) Ubiquitin and the control of protein fate in the secretory and endocytic pathways. *Annu Rev Cell Dev Biol*, **14**, 19-57.

- Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, **72**, 248-254.
- Broach, J. R., Pringle, J. R. y Jones, E. W. (Eds.) (1997): The Molecular and Cellular Biology of the Yeast *Saccharomyces*, (Vol. 3). Cell cycle and cell biology. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Bryant, N.J. y Stevens, T.H. (1998) Vacuole biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*: protein transport pathways to the yeast vacuole. *Microbiol Mol Biol Rev*, **62**, 230-247.
- Bukau, B. y Horwich, A.L. (1998) The Hsp70 and Hsp60 chaperone machines. *Cell*, **92**, 351-366.
- Bursch, W., Hochegger, K., Torok, L., Marian, B., Ellinger, A. y Hermann, R.S. (2000) Autophagic and apoptotic types of programmed cell death exhibit different fates of cytoskeletal filaments. *J Cell Sci*, **113** (Pt 7), 1189-1198.
- Corsi, A.K. y Schekman, R. (1996) Mechanism of polypeptide translocation into the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem*, **271**, 30299-30302.
- Cowles, C.R., Snyder, W.B., Burd, C.G. y Emr, S.D. (1997) Novel Golgi to vacuole delivery pathway in yeast: identification of a sorting determinant and required transport component. *Embo J*, **16**, 2769-2782.
- Chiang, H.L. y Schekman, R. (1991) Regulated import and degradation of a cytosolic protein in the yeast vacuole. *Nature*, **350**, 313-318.
- Darsow, T., Rieder, S.E. y Emr, S.D. (1997) A multispecificity syntaxin homologue, Vam3p, essential for autophagic and biosynthetic protein transport to the vacuole. *J Cell Biol*, **138**, 517-529.
- Di Como, C.J. y Arndt, K.T. (1996) Nutrients, via the Tor proteins, stimulate the association of Tap42 with type 2A phosphatases. *Genes Dev*, **10**, 1904-1916.
- Donaldson, J.G. y Lippincott-Schwartz, J. (2000) Sorting and signaling at the Golgi complex. *Cell*, **101**, 693-696.
- Dunn, W.A., Jr. (1990a) Studies on the mechanisms of autophagy: formation of the autophagic vacuole. *J Cell Biol*, **110**, 1923-1933.
- Dunn, W.A., Jr. (1990b) Studies on the mechanisms of autophagy: maturation of the autophagic vacuole. *J Cell Biol*, **110**, 1935-1945.
- Fischer von Mollard, G. y Stevens, T.H. (1999) The *Saccharomyces cerevisiae* v-SNARE Vti1p is required for multiple membrane transport pathways to the vacuole. *Mol Biol Cell*, **10**, 1719-1732.
- Gancedo, C. (1971) Inactivation of fructose-1,6-diphosphatase by glucose in yeast. *J Bacteriol* **107**, 401-405.
- Gancedo, J.M. (1992) Yeast carbon catabolite repression. *Microbiol Mol Biol Rev*, **62**, 334-361.
- Gotte, M. y von Mollard, G.F. (1998) A new beat for the SNARE drum. *Trends Cell Biol*, **8**, 215-218.

- Guan, J., Stromhaug, P.E., George, M.D., Habibzadegah-Tari, P., Bevan, A., Dunn, W.A., Jr. y Klionsky, D.J. (2001) Cvt18/Gsa12 Is Required for Cytoplasm-to-Vacuole Transport, Pexophagy, and Autophagy in *Saccharomyces cerevisiae* and *Pichia pastoris*. *Mol Biol Cell*, **12**, 3821-3838.
- Glover, D. M. (Ed.) (1985). DNA Cloning (Vol.2). Cloning in Yeast: 45-46. IRL Press. Oxford. England.
- Hammond, E.M., Brunet, C.L., Johnson, G.D., Parkhill, J., Milner, A.E., Brady, G., Gregory, C.D. y Grand, R.J. (1998) Homology between a human apoptosis specific protein and the product of APG5, a gene involved in autophagy in yeast. *FEBS Lett*, **425**, 391-395.
- Hanahan, D. (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol*, **166**, 557-580.
- Harding, T.M., Morano, K.A., Scott, S.V. y Klionsky, D.J. (1995) Isolation and characterization of yeast mutants in the cytoplasm to vacuole protein targeting pathway. *J Cell Biol*, **131**, 591-602.
- Harding, T.M., Hefner-Gravink, A., Thumm, M. y Klionsky, D.J. (1996) Genetic and phenotypic overlap between autophagy and the cytoplasm to vacuole protein targeting pathway. *J Biol Chem*, **271**, 17621-17624.
- Holmes, D.S. y Quigley, M. (1981) A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. *Anal Biochem*, **114**, 193-197.
- Hutchins, M.U., Veenhuis, M. y Klionsky, D.J. (1999) Peroxisome degradation in *Saccharomyces cerevisiae* is dependent on machinery of macroautophagy and the Cvt pathway. *J Cell Sci*, **112** (Pt 22), 4079-4087.
- Hutchins, M.U. y Klionsky, D.J. (2001) Vacuolar localization of oligomeric alpha-mannosidase requires the cytoplasm to vacuole targeting and autophagy pathway components in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*, **276**, 20491-20498.
- Ichimura, Y., Kirisako, T., Takao, T., Satomi, Y., Shimonishi, Y., Ishihara, N., Mizushima, N., Tanida, I., Kominami, E., Ohsumi, M., Noda, T. y Ohsumi, Y. (2000) A ubiquitin-like system mediates protein lipidation. *Nature*, **408**, 488-492.
- Ishihara, N., Hamasaki, M., Yokota, S., Suzuki, K., Kamada, Y., Kihara, A., Yoshimori, T., Noda, T. y Ohsumi, Y. (2001) Autophagosome requires specific early Sec proteins for its formation and NSF/SNARE for vacuolar fusion. *Mol Biol Cell*, **12**, 3690-3702.
- Ito, H., Fukuda, Y., Murata, K. y Kimura, A. (1983) Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations. *J Bacteriol*, **153**, 163-168.
- James, P., Halladay, J. y Craig, E.A. (1996) Genomic libraries and a host strain designed for highly efficient two-hybrid selection in yeast. *Genetics*, **144**, 1425-1436.
- Jia, L., Dourmashkin, R.R., Allen, P.D., Gray, A.B., Newly, A.C. y Kelsey, S.M. (1997) Inhibition of autophagy abrogates tumour necrosis factor alpha induced apoptosis in human T-lymphoblastic leukaemic cells. *Br J Haematol*, **98**, 673-685.
- Jiang, Y. y Broach, J.R. (1999) Tor proteins and protein phosphatase 2A reciprocally regulate Tap42 in controlling cell growth in yeast. *Embo J*, **18**, 2782-2792.

- Jones, E.W. (1991) Three proteolytic systems in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*, **266**, 7963-7966.
- Kamada, Y., Funakoshi, T., Shintani, T., Nagano, K., Ohsumi, M. y Ohsumi, Y. (2000) Tor-mediated induction of autophagy via an Apg1 protein kinase complex. *J Cell Biol*, **150**, 1507-1513.
- Kihara, A., Noda, T., Ishihara, N. y Ohsumi, Y. (2001) Two distinct Vps34 phosphatidylinositol 3-kinase complexes function in autophagy and carboxypeptidase Y sorting in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol*, **152**, 519-530.
- Kim, J., Scott, S.V., Oda, M.N. y Klionsky, D.J. (1997) Transport of a large oligomeric protein by the cytoplasm to vacuole protein targeting pathway. *J Cell Biol*, **137**, 609-618.
- Kim, S., Schilke, B., Craig, E.A. y Horwich, A.L. (1998) Folding in vivo of a newly translated yeast cytosolic enzyme is mediated by the SSA class of cytosolic yeast Hsp70 proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 12860-12865.
- Kim, J. y Klionsky, D.J. (2000) Autophagy, cytoplasm-to-vacuole targeting pathway, and pexophagy in yeast and mammalian cells. *Annu Rev Biochem*, **69**, 303-342.
- Kim, J., Huang, W.P. y Klionsky, D.J. (2001) Membrane recruitment of Aut7p in the autophagy and cytoplasm to vacuole targeting pathways requires Aut1p, Aut2p, and the autophagy conjugation complex. *J Cell Biol*, **152**, 51-64.
- Kirchhausen, T. (2000) Three ways to make a vesicle. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **1**, 187-198.
- Kirisako, T., Baba, M., Ishihara, N., Miyazawa, K., Ohsumi, M., Yoshimori, T., Noda, T. y Ohsumi, Y. (1999) Formation process of autophagosome is traced with Apg8/Aut7p in yeast. *J Cell Biol*, **147**, 435-446.
- Kirisako, T., Ichimura, Y., Okada, H., Kabeya, Y., Mizushima, N., Yoshimori, T., Ohsumi, M., Takao, T., Noda, T. y Ohsumi, Y. (2000) The reversible modification regulates the membrane-binding state of Apg8/Aut7 essential for autophagy and the cytoplasm to vacuole targeting pathway. *J Cell Biol*, **151**, 263-276.
- Klionsky, D.J., Cueva, R. y Yaver, D.S. (1992) Aminopeptidase I of *Saccharomyces cerevisiae* is localized to the vacuole independent of the secretory pathway. *J Cell Biol*, **119**, 287-299.
- Klionsky, D.J. (1998) Nonclassical protein sorting to the yeast vacuole. *J Biol Chem*, **273**, 10807-10810.
- Klionsky, D.J. y Emr, S.D. (2000) Autophagy as a regulated pathway of cellular degradation. *Science*, **290**, 1717-1721.
- Kuma, A., Mizushima, N., Ishihara, N. y Ohsumi, Y. (2002) Formation of the ~350 kD Apg12-Apg5-Apg16 multimeric complex, mediated by Apg16 oligomerization, is essential for autophagy in yeast. *J Biol Chem*, en prensa.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685.
- Leber, R., Silles, E., Sandoval, I.V. y Mazon, M.J. (2001) Yoi082p, a novel CVT protein involved in the selective targeting of aminopeptidase I to the yeast vacuole. *J Biol Chem*, **276**, 29210-29217.

- Schwartz, L.M., Smith, S.W., Jones, M.E. y Osborne, B.A. (1993) Do all programmed cell deaths occur via apoptosis? *Proc Natl Acad Sci U S A*, **90**, 980-984.
- Seglen, P.O., Berg, T.O., Blankson, H., Fengsrud, M., Holen, I. y Stromhaug, P.E. (1996) Structural aspects of autophagy. *Adv Exp Med Biol*, **389**, 103-111.
- Seguí-Real, B., Martínez, M. y Sandoval, I.V. (1995) Yeast aminopeptidase I is post-translationally sorted from the cytosol to the vacuole by a mechanism mediated by its bipartite N-terminal extension. *Embo J*, **14**, 5476-5484.
- Shulga, N., Roberts, P., Gu, Z., Spitz, L., Tabb, M.M., Nomura, M. y Goldfarb, D.S. (1996) In vivo nuclear transport kinetics in *Saccharomyces cerevisiae*: a role for heat shock protein 70 during targeting and translocation. *J Cell Biol*, **135**, 329-339.
- Silles, E., Mazón, M.J., Gevaert, K., Goethals, M., Vandekerckhove, J., Leber, R. y Sandoval, I.V. (2000) Targeting of aminopeptidase I to the yeast vacuole is mediated by Ssa1p, a cytosolic member of the 70-kDa stress protein family. *J Biol Chem*, **275**, 34054-34059.
- Skehel, J.J. y Wiley, D.C. (1998) Coiled coils in both intracellular vesicle and viral membrane fusion. *Cell*, **95**, 871-874.
- Stromhaug, P.E. y Klionsky, D.J. (2001) Approaching the molecular mechanism of autophagy. *Traffic*, **2**, 524-531.
- Subramani S. (2001) Self-destruction in the line of duty. *Dev Cell*, **1**, 6-8.
- Takehige, K., Baba, M., Tsuboi, S., Noda, T. y Ohsumi, Y. (1992) Autophagy in yeast demonstrated with proteinase-deficient mutants and conditions for its induction. *J Cell Biol*, **119**, 301-311.
- Tanida, I., Mizushima, N., Kiyooka, M., Ohsumi, M., Ueno, T., Ohsumi, Y. y Kominami, E. (1999) Apg7p/Cvt2p: A novel protein-activating enzyme essential for autophagy. *Mol Biol Cell*, **10**, 1367-1379.
- Thomas, B.J. y Rothstein, R. (1989) Elevated recombination rates in transcriptionally active DNA. *Cell*, **56**, 619-630.
- Tsukada, M. y Ohsumi, Y. (1993) Isolation and characterization of autophagy-defective mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett*, **333**, 169-174.
- Uetz, P., Giot, L., Cagney, G., Mansfield, T.A., Judson, R.S., Knight, J.R., Lockshon, D., Narayan, V., Srinivasan, M., Pochart, P., Qureshi-Emili, A., Li, Y., Godwin, B., Conover, D., Kalbfleisch, T., Vijayadamodar, G., Yang, M., Johnston, M., Fields, S. y Rothberg, J.M. (2000) A comprehensive analysis of protein-protein interactions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature*, **403**, 623-627.
- Vida, T.A., Herman, P.K., Emr, S.D. y Graham, T.R. (1991) Compartmentalized transport, modification, and sorting of yeast vacuolar hydrolases. *Biomed Biochim Acta*, **50**, 413-420.
- Wach, A., Brachat, A., Pohlmann, R. y Philippsen, P. (1994) New heterologous modules for classical or PCR-based gene disruptions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, **10**, 1793-1808.

Wach, A., Brachat, A., Alberti-Segui, C., Rebischung, C. y Philippsen, P. (1997) Heterologous HIS3 marker and GFP reporter modules for PCR-targeting in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, **13**, 1065-1075.

Wang, Y.X., Catlett, N.L. y Weisman, L.S. (1998) Vac8p, a vacuolar protein with armadillo repeats, functions in both vacuole inheritance and protein targeting from the cytoplasm to vacuole. *J Cell Biol*, **140**, 1063-1074.

Werner-Washburne, M., Stone, D.E. y Craig, E.A. (1987) Complex interactions among members of an essential subfamily of hsp70 genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*, **7**, 2568-2577.

Yoshihisa, T. y Anraku, Y. (1990) A novel pathway of import of alpha-mannosidase, a marker enzyme of vacuolar membrane, in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*, **265**, 22418-22425.

Anexo: publicaciones

La mayor parte del trabajo que se muestra en esta Memoria ha sido ya publicado en los siguientes artículos:

Silles, E., Mazón, M.J., Gevaert, K., Goethals, M., Vandekerckhove, J., Leber, R. y Sandoval, I.V. (2000) Targeting of aminopeptidase I to the yeast vacuole is mediated by Ssa1p, a cytosolic member of the 70-kDa stress protein family. *J Biol Chem*, **275**, 34054-34059.

Leber, R., Silles, E., Sandoval, I.V. y Mazon, M.J. (2001) Yol082p, a novel CVT protein involved in the selective targeting of aminopeptidase I to the yeast vacuole. *J Biol Chem*, **276**, 29210-29217.

También ha sido publicado parte del trabajo que se ha llevado a cabo durante la realización de la Tesis, que no se ha mostrado en esta Memoria:

Martínez, E., Seguí-Real, B., Silles, E., Mazón, M.J. y Sandoval, I.V. (1999) The prepropeptide of vacuolar aminopeptidase I is necessary and sufficient to target the fluorescent reporter protein GFP to the vacuole of yeast by the Cvt pathway. *Mol Microbiol*, **33**, 52-62.

Estos tres artículos se incluyen a continuación en este anexo.

Targeting of Aminopeptidase I to the Yeast Vacuole Is Mediated by Ssa1p, a Cytosolic Member of the 70-kDa Stress Protein Family*

Received for publication, April 25, 2000, and in revised form, July 18, 2000
Published, JBC Papers in Press, July 19, 2000, DOI 10.1074/jbc.M003514200

Eduardo Sillescu[†], María J. Mazón[‡], Kris Gevaert^{§**}, Marc Goethals^{||}, Joel Vandekerckhove^{||††},
Regina Leber^{§§}, and Ignacio V. Sandoval^{§¶¶}

From the [†]Instituto de Investigaciones Biomédicas Alberto Sols, Consejo Superior Investigaciones Científicas-Universidad Autónoma de Madrid, 28029 Madrid, Spain, the [‡]Flanders Interuniversity Institute for Biotechnology, Department of Biochemistry, Universiteit Gent, Ledeganckstraat 35, B-9000 Gent, Belgium, and the [§]Centro de Biología Molecular Severo Ochoa, Consejo Superior Investigaciones Científicas-Facultad de Ciencias, Universidad Autónoma de Madrid, 28049 Madrid, Spain

The two cytosolic members of the highly conserved 70-kDa stress protein family, Ssa1p and Ssa2p, were specifically retained by the prepro-NH₂ extension of the vacuolar aminopeptidase I precursor (pAPI) conjugated to agarose (Sulfolink). A temperature-sensitive mutant strain a1^{aa}a234 (*ssa1^{aa} ssa2 ssa3 ssa4*), when incubated at the restrictive temperature, was able to assemble the API precursor into dodecamers, but failed to pack pAPI into vesicles and to convert it into mature API (mAPI), a process that occurs in the vacuole. Altogether these results indicate that Ssa1p mediates the targeting of pAPI to the vacuole.

ent membrane bound structures to sequester the Cvt complex and deliver pAPI to the vacuole. It has been proposed that, during vegetative growth, the Cvt complex is selectively wrapped by a double membrane sac (10) or translocated to a prevacuolar compartment (5), whereas in cells subjected to starvation conditions the Cvt complex is taken up by an autophagosome (10).

While searching for proteins interacting with the prepro-NH₂ extension of pAPI, the segment that mediates the transport of the protein precursor to the vacuole (5, 11), we have observed its specific *in vitro* interaction with Ssa1p and Ssa2p, two highly homologous members of the cytosolic hsp70 family that are constitutively expressed during logarithmic growth and have been involved in protein folding and translocation (12–14). To study the role of Ssa1p in the targeting of pAPI to the vacuole, we analyzed this process in a mutant strain carrying a temperature-sensitive allele of *SSA1* and inactivated alleles of the *SSA2*, *SSA3*, and *SSA4* genes. We show here that targeting of the pAPI to the vacuole is mediated by Ssa1p under both growing and nitrogen starvation conditions.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Yeast Strains and Media—To generate the yeast strains used in this work we introduced mutations in each of the four *SSA* genes in the W303-1b genetic background. Gene disruptions of *SSA2*, *SSA3*, and *SSA4* were performed by the short flanking homology technique (15). *ssa2::LEU2* and *ssa3::TRP1* disruption cassettes were amplified by PCR using genomic DNA of strain a1-45 (12) as template. *SSA4* was replaced by the dominant-resistant module *KanMX*, which confers resistance to Geneticin (16). The PCR fragments contained in their 3' and 5' ends a minimum of 45 base pairs homologous to the flanking regions of the target gene, thus allowing for homologous recombination at their genomic loci. Disruption cassettes were consecutively transformed into W303-1b cells (17), and disruption of each gene was verified by analytical PCR using specific oligonucleotides for the 5' and 3' regions of the corresponding gene. The resultant strain, deleted for *SSA2*, *SSA3*, and *SSA4*, was named ESY170 (see Table I). To obtain strain ESY216 (*ssa1^{aa}ssa2ssa3ssa4*) a 1.7-kilobase pair *KpnI-SphI* fragment of the *ssa1* temperature-sensitive allele in strain a1-45, containing mutation Pro⁴¹⁷ to Leu (12), was amplified and cloned in the integrative vector pRS306 (*URA3*) (18), digested at the unique *ClaI* site internal to the cloned fragment, and transformed into strain ESY170. Transformants being both Ura⁻ and temperature-sensitive for growth were counterselected in fluorotic acid-containing plates and analyzed again for temperature sensitivity. Correct integration and presence of the Pro⁴¹⁷ → Leu mutation were confirmed by PCR and sequencing. Strain ESY228 was constructed by disrupting the *API* gene using the *HIS3* marker as described previously (5). ESY228 was used to overexpress the *API* gene carried in a 2- μ plasmid under the control of the *GAL1-10* promoter (5). The genotypes of all the strains used in these studies are listed in Table I. The pGAL-*API* has been described previously (5, 11).

Yeast cells were grown in synthetic minimal medium: 0.67% yeast nitrogen base, 2% glucose (SD), 2% raffinose (SRaf), or 2% galactose

The yeast vacuolar protein aminopeptidase I (API)¹ is synthesized as a cytosolic precursor and transported to the vacuole by a cytoplasm to vacuole targeting pathway (1, 2). Genetic studies indicate that this pathway uses many of the molecular components of the degradative autophagy pathway (3, 4). API transport is made specific and saturable by an unknown receptor that appears to recognize specific transport motifs in the prepro-NH₂ extension of the pAPI (5–7).

There is evidence that, soon after its synthesis, pAPI is assembled into homododecamers (8), which become associated with spherical particles (termed Cvt complex) and are delivered to the vacuole by a vesicle-mediated mechanism (9, 10). Depending on the environmental conditions, the cell uses differ-

* This work was supported by a grant from the European Community (EC) (FMRX-CT96-0058) (to I. V. S. and M. J. M.) and by grants from the Comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología (94-0035) (to I. V. S.) and the Fondo de Investigaciones Sanitarias (98/279) (to M. J. M.). The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

[†] Funded by Biomed Program (EC) BMH4-CT96-0010.

^{§§} Funded by Training and Mobility Research Program (EC) FMRX-CT96-0058.

^{**} Research Assistant of the FWO-Flanders.

^{||} Funded by the Concerted Research Actions (GOA) from the Flemish Community and the Fund for Scientific Research (FWO) Flanders (Belgium).

^{||††} To whom correspondence should be addressed: Centro de Biología Molecular Severo Ochoa, CSIC-Facultad de Ciencias, Universidad Autónoma de Madrid, 28049 Madrid, Spain. Tel.: 34-913978455; Fax: 34-913974799; E-mail, isandoval@cbm.uam.es.

¹ The abbreviations used are: API, yeast vacuolar leucine aminopeptidase I; pAPI, API precursor; mAPI, mature API; Cvt, cytoplasm to vacuole targeting; MALDI, matrix-assisted laser desorption ionization; PSD, post-source decay; RP-HPLC, reverse phase high pressure liquid chromatography; PCR, polymerase chain reaction; PAGE, polyacrylamide gel electrophoresis; Pipes, 1,4-piperazinediethanesulfonic acid.

TABLE I
Yeast strains used in this study

Strain	Name used in text	Genotype	Source
a1-45		MAT α his3-11, 15 leu2-3, 112 trp1- Δ 1 lys2 ura3-52 ssa1 ⁺ ssa2::LEU2 ssa3::TRP1 ssa4::LYS2	Ref. 12
W303-1b	Wild type	MAT α ade2-1 his3-11, 15 leu2-3, 112 trp1-1 ura3-1 can1-100	Ref. 17
ESY170	A1a234	W303-1b; MAT α ade2-1 his3-11, 15 leu2-3, 112 trp1-1 ura3-1 can1-100 SSA1 ssa2::LEU2 ssa3::TRP1 ssa4::KanMX	This study
ESY216	a1 ⁺ a234	W303-1b; MAT α ade2-1 his3-11, 15 leu2-3, 112, trp1-1 ura3-1 can1-100 ssa1 ⁺ ssa2::LEU2 ssa3::TRP1 ssa4::KanMX	This study
ESY228	a1 ⁺ a234 Δ ape1	W303-1b; MAT α ade2-1 his3-11, 15 leu2-3, 112, trp1-1 ura3-1 can1-100 ssa1 ⁺ ssa2::LEU2 ssa3::TRP1 ssa4::KanMX ape1::HIS3	This study

(SGal) and the appropriate auxotrophic requirements. Synthetic minimal medium containing 2% glucose and 0.17% yeast nitrogen base without amino acids and ammonium sulfate (SD-N) was used for nitrogen starvation experiments.

Standard techniques for yeast strain propagation and genetic manipulation were used as described (19). Yeast transformation was performed by the method of Ito *et al.* (20) and DNA manipulations as described (21).

Purification of Ssa1p/Ssa2p by Affinity Chromatography—60 ml of SD medium containing the appropriate requirements were inoculated with W303-1b cells and grown overnight at 30 °C. Cells were harvested in the logarithmic phase by centrifugation, resuspended in 2 ml of yeast nitrogen base without amino acids and ammonium sulfate prepared to 0.17%, 0.4% NH₄Cl, 0.3% glucose, incubated for 30 min at 30 °C and labeled for 1 h at 30 °C with 1 mCi of [³⁵S]methionine/cysteine (specific activity > 1000 Ci/ml; Promix, Amersham Pharmacia Biotech). The cells were then washed with cold phosphate-buffered saline, 0.15 M NaCl (PNC buffer), disrupted with glass beads in 1 ml of the same buffer, phenylmethylsulfonyl fluoride added to 1 mM, and cell debris removed by centrifugation two times for 10 min at 2000 × g. The resulting extract was centrifuged for 30 min at 150,000 × g in a TL100.3 rotor (Beckman) and the supernatant (S150) made 2% in Triton X-100, whereas the pellet (P150) was resuspended in 1 ml of PNC buffer, 2% Triton X-100 incubated for 30 min at 4 °C and then centrifuged for 30 min at 150,000 × g.

The 43-amino acid-long MEEQREILEQLKKTLLQMLTVEPSKNNQIANEKEKKNENSWC-COOH and MEEQREGLEQLKKTLLQMLTVEPSKNNQIANEKEKKNENSWC-COOH peptides from the prepro-NH₂ extension of the pAPI (prepro-peptide) were coupled to agarose (Sulfolink) (Pierce) at a ratio of 5 mg/ml gel, according to the manufacturer's instructions (Pierce). The S150 and P150 fractions were mixed with 1 volume of PNC buffer and incubated overnight with the prepro-peptide conjugated to agarose (Sulfolink). The resin was then washed three times for 15 min with PNC buffer, 0.5% Triton X-100, once for 15 min with phosphate-buffered saline, 1 M NaCl, 0.5% Triton X-100, and then quickly with water. Aliquots from the yeast crude extract, the S150 and P150 fractions, the fourth wash, and the washed resin were boiled in Laemmli buffer, resolved by SDS-12% PAGE, and the electrophoretograms analyzed for protein both by Coomassie Blue staining and autoradiography.

The 70-kDa polypeptide retained by the affinity resin was in-gel digested with trypsin and the generated peptides separated by RP-HPLC, concentrated on Poros R2-beads, and transferred to the MALDI target as described previously (22). For protein identification, peptide ions were subjected to post-source decay (PSD) analysis and the Sequest algorithm (23, 24) used to search in a nonredundant protein data base containing over 290,000 entries with the experimental fragmentation pattern.

Studies on the Processing of the pAPI into mAPI—A1a234 and a1⁺a234 cells grown overnight at 24 °C in SD medium to 1 OD₆₀₀ and, when required, starved for 2 h in SD-N medium, were concentrated to 25 OD₆₀₀ and incubated in fresh medium at 24 °C for 30 min. The cell suspension was divided in two, then incubated at 24 or 37 °C for 2 min, and the cells labeled for 10 min with 50 μ Ci of [³⁵S]methionine/cysteine (Promix, Amersham Pharmacia Biotech) per OD₆₀₀ unit. The labeled protein was chased by resuspension of the cells in SD or SD-N medium containing 4 mM cysteine and 8 mM methionine. Chasing was terminated by addition of cold trichloroacetic acid to a final concentration of 5%. The protein precipitates were left on ice for 15 min, collected by centrifugation at low speed, washed with cold acetone, dried, and upon

their freezing in liquid nitrogen, resuspended in 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 5 mM EDTA (buffer S) containing 1% SDS by vigorous vortexing using glass beads. Samples were then boiled for 4 min, diluted 5-fold in 2.5 volumes with buffer S, and then made 0.25% Tween 20 and 0.1 M NaCl. Equal amounts of protein were incubated for 2 h at 4 °C with rabbit anti-API serum (5) and then for 1 h with protein G-Sepharose. The immunoprecipitates were washed five times with buffer S, 0.15 M NaCl, boiled in Laemmli buffer, resolved by SDS-10% PAGE, and the fixed gels treated with 1 M sodium salicylate, dried, and autoradiographed.

Protease Protection Experiments—a1⁺a234 cells were grown at 24 °C to 1 OD₆₀₀ in SD medium, spheroplasted, and metabolically labeled and chased at 24 and 37 °C. Spheroplasts were adjusted to 15 OD₆₀₀/ml with SL medium (1 M sorbitol, 1% glucose, 1% proline, 0.17% yeast nitrogen base without amino acids and ammonium sulfate, with the appropriate auxotrophic requirements) (2), and 1 ml was preincubated for 20 min and metabolically labeled for 10 min with 100 μ Ci of [³⁵S]methionine/cysteine per OD₆₀₀ at the temperature of choice. Labeled spheroplasts were then diluted 10-fold in SL medium containing 8 mM methionine, 4 mM cysteine, and 0.2% yeast extract and chased for 2 min or 4 h. Chases were stopped by incubation for 2 min with 10 mM NaN₃ and lysates from spheroplasts prepared by osmotic lysis in 200 mM sorbitol, 5 mM MgCl₂, 20 mM Pipes, pH 6.8. Unlysed spheroplasts were removed by centrifugation for 2 min at 500 × g. Lysates were treated at 4 °C for 30 min with 50 μ g/ml proteinase K (Life Technologies, Inc.) in the absence and presence of 0.2% Triton X-100. Digestion by the protease was stopped with a mixture of protease inhibitors (5 mM EDTA, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, and pepstatin, aprotinin, and leupeptin at 1 μ g/ml each) and the protein precipitated with trichloroacetic acid, using 100 μ g/ml bovine serum albumin as carrier, and API immunoprecipitated as described above and analyzed by SDS-10% PAGE and autoradiography.

Analysis of API Dodecamers by Sedimentation Velocity Centrifugation—a1⁺a234 Δ ape1 cells carrying the 2- μ pGAL-API were grown in S Raf medium overnight to 1 OD₆₀₀ and then shifted to SGal medium for 4 h at 24 or 37 °C. The cells were incubated the last 15 min in SGal medium with or without 20 mM NaN₃, harvested by low speed at the corresponding temperatures, and immediately frozen in liquid nitrogen. Crude cell extracts prepared with glass beads in cold 50 mM Tris-HCl, pH 8, 5 mM EDTA, and protease inhibitors were fractionated by centrifugation on glycerol (20–50%) (8) and the gradient fractions scrutinized for API by Western blot using the rabbit polyclonal anti-API antibody.

RESULTS

The Heat Shock Proteins Ssa1p and Ssa2p Are Specifically Retained by Prepro(API)-Peptidyl-Agarose Affinity Resin—Incubation of [³⁵S]methionine/cysteine-labeled S150 and P150 fractions with prepro(API)-peptidyl-agarose (Sulfolink) resulted in specific retention of a 70-kDa polypeptide as shown both by Coomassie Blue staining and autoradiography (Fig. 1A). The mass spectrometric screening of HPLC fractions from a trypsin digest of the 70-kDa polypeptide showed that 16 out of 18 collected fractions contained peptide material. The peptide ion with a *m/z* value of 1424.63 in fraction 7 (Fig. 1B, left) was subjected to PSD analysis (Fig. 1B, right). After manually denoting all the γ ions displayed in the PSD spectrum (23), a sequence tag (303.14) SEQ/KEDE (1020.06) was obtained. Ad-

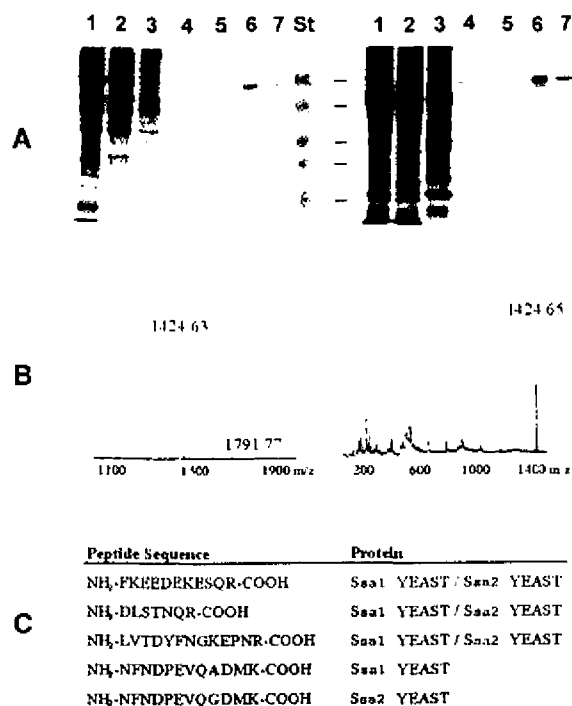


FIG. 1. A, retention of a 70-kDa peptide by prepro-API-peptidyl-affinity chromatography. Growing W303-1b cells were labeled with 1 mCi of [³⁵S]methionine/cysteine, extracted, fractionated, incubated with prepro-API-Sulfolink affinity resin, and the resin washed and eluted as described under "Experimental Procedures." The proteins were resolved by SDS-PAGE, stained by Coomassie Blue (A, left) and analyzed by autoradiography (A, right): crude extract (lane 1), S150 fraction (lane 2), P150 fraction (lane 3), proteins from the S150 (lanes 4 and 6) and P150 fractions (lanes 5 and 7) retained by the resin and eluted with 1 M NaCl (lanes 4 and 5) or by boiling in Laemli buffer (lanes 6 and 7). B, characterization of the in-gel-digested 70-kDa polypeptide as Ssa1p/Ssa2p by mass spectrometry analysis. B, left, linear delayed extraction MALDI mass spectrometry spectrum of fraction 7 after RP-HPLC separation of the trypsin Ssa1p and Ssa2p digests; B, right, MALDI-PSD spectrum of the peptide with a mass of 1424.63 Da contained in fraction 7 from RP-HPLC and having the sequence NH₂-FKEEDEKESQR-COOH from the yeast Ssa1p and Ssa2p proteins. C, common and unique peptides sequenced from Ssa1p and Ssa2p using MALDI-PSD.

ditional information regarding the presence of phenylalanine and serine residues in the peptide was deduced from the detection of specific ammonium ions of both amino acids. The search of the peptide in a nonredundant protein data base using the Sequest algorithm (24) led to the NH₂-FKEEDEKESQR-COOH sequence present in the Ssa1p and Ssa2p proteins of yeast (Fig. 1C). This finding was confirmed by PSD analysis of two other peptide ions present in both the Ssa1p and Ssa2p proteins (Fig. 1C). Moreover, 15 peptide masses shared by both homologue proteins could be identified in the different HPLC fractions. One peptide mass was found to be unique for Ssa1p and three for Ssa2p. The presence of both proteins Ssa1p and Ssa2p in the polypeptide band was confirmed by PSD analysis of two of these unique peptides (Fig. 1C).

To further investigate if the interaction of the Ssa1p/Ssa2p pair with the prepro-NH₂ extension of the pAPI required a structural motif contained in the primary or secondary structure of the peptide, the Ile residue in position 7 was substituted by a Gly. This substitution has been shown to disrupt the α -helix conformation of the peptide into a random coil and to inhibit the transport of the pAPI to the vacuole (7). We observed that the introduction of Gly in position 7 did not suppress the retention of the Ssa1p and Ssa2p by prepro(API)-

peptidyl affinity columns (data not shown), thus indicating that the two chaperones recognized a motif contained in the primary structure of the peptide (see "Discussion").

Targeting of the pAPI to the Vacuole by the Cvt Pathway Is Mediated by Ssa1p—To examine whether Ssa1p was actually involved in the targeting of the pAPI to the vacuole, we studied the processing of the pAPI by a1^{ts}a234 cells. These cells were developed by introducing the disrupted SSA2, SSA3, and SSA4 genes as well as a ssa1^{ts} allele from a1-45 cells (12) in the genetic background of W303-1b. After their shift to the nonpermissive temperature, the a1-45 cells have been shown to stop growing immediately as well as to undergo defects in the translocation and processing of several ER and mitochondrial protein precursors (12).

Processing of the pAPI into the mature form was first studied in a1^{ts}a234 cells under vegetative conditions (Fig. 2). The cells were pulse-labeled for 10 min with [³⁵S]methionine/cysteine at either 24 or 37 °C and then chased for periods between 0 and 120 min. Processing was analyzed by autoradiography of the precursor and mAPI species immunoprecipitated and separated by SDS-PAGE. It was observed that whereas the precursor was converted into the mature form at 24 °C, the permissive temperature for Ssa1p activity, the conversion was completely inhibited at the restrictive temperature. These results strongly suggest that cytosolic Ssa1p is involved in the transport of the pAPI to the vacuole where its conversion into the mature form occurs. Furthermore, the absence of mAPI species after the 120-min chase at the restrictive temperature (Fig. 2B, lane 3) strongly suggests that in the absence of Ssa1p the mechanism of API transport is blocked rather than slowed down.

To study whether Ssa1p mediates the transport of pAPI to the vacuole in starved cells, a1^{ts}a234 cells grown in SD medium at 24 °C were subjected to nitrogen starvation for 2.5 h. Transport of the pAPI to the vacuole was studied in a pulse-chase experiment as described above. As observed in vegetative cells the starved cells were able to process the pAPI into the mature form at 24 °C but not at 37 °C (Fig. 2). This result indicates that Ssa1p is also essential for the transport of the pAPI to the vacuole in nitrogen-starved cells.

Previous studies have shown that cells carrying the ssa1^{ts} allele recovered their ability to grow upon shifting the incubation temperature from 37 to 24 °C (12). We, therefore, investigated whether the recovery of the Ssa1p activity at the permissive temperature rescued the processing of newly synthesized pAPI molecules. For this purpose, first, a1^{ts}a234 cells preincubated at 37 °C for 30 min were labeled at 24 °C for 10 min with [³⁵S]methionine/cysteine, and after their chase at the same temperature for 0, 30, 60, and 120 min the conversion of pAPI into mAPI analyzed by immunoprecipitation and autoradiography. The study revealed a progressive conversion of pAPI into mAPI in the 60–120-min period (Fig. 3A), thus indicating that the inhibition of the pAPI transport to the vacuole was reversed. Furthermore, when the experiment was repeated by performing the labeling at 37 °C, the result was comparable (Fig. 3B). This result indicated that the pAPI synthesized at 37 °C was rescued at the permissive temperature and transported and processed in the vacuole (see "Discussion").

Assembly of the pAPI into Dodecamers Does Not Require Ssa1p—The observation that newly synthesized pAPI molecules are assembled into homododecamers in the cytoplasm and transported in this form into the vacuole (8) prompted us to study if Ssa1p was required for their assembly. For this purpose, a1^{ts}a234 Δ ape1 cells carrying the pGAL-API plasmid were induced with galactose for 4 h at both 24 and 37 °C and crude extracts fractionated by sedimentation velocity centrifugation

FIG. 2. Processing of pAPI into mAPI is inhibited in growing and nitrogen starved $a1^{\Delta}a234$ cells at the restrictive temperature. A1a234 and $a1^{\Delta}a234$ cells grown in SD medium (*i.e.* vegetative conditions) and incubated further for 2.5 h in SD-N medium (*i.e.* starvation conditions) (see "Experimental Procedures") were incubated at 24 or 37 °C for 2 min and then pulse-labeled for 10 min with [35 S]methionine/cysteine and chased for the indicated times at the corresponding temperature. Processing of cell extracts and analysis of the API species were performed by immunoprecipitation and autoradiography as described under "Experimental Procedures."

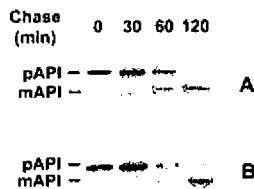
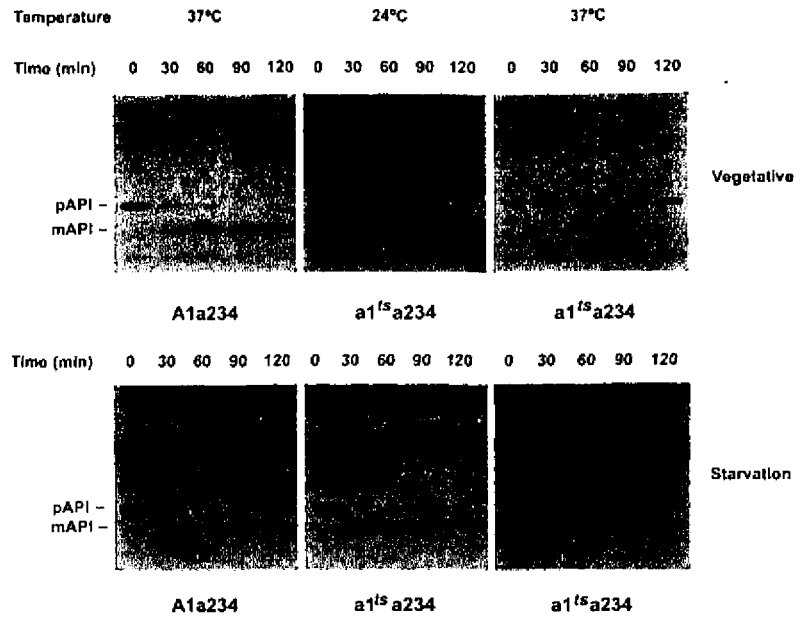


FIG. 3. Shift from 37 to 24 °C restores processing of pAPI in $a1^{\Delta}a234$ cells. $a1^{\Delta}a234$ cells grown in SD medium at 24 °C were incubated at 37 °C for 20 min and then labeled with [35 S]methionine/cysteine for 10 min at the same temperature (B) or were preincubated first at 37 °C for 30 min and then at 24 °C for 3 min before their labeling at 24 °C for 10 min (A). In both experiments labeled pAPI was chased for the indicated times at the permissive temperature. Analysis of the API species was performed as described in the legend to Fig. 2.

in glycerol gradients as described (8). Western analysis of the gradient fractions using an anti-API specific antibody showed that at both temperatures pAPI migrated with the mobility expected for dodecamers (Fig. 4), thus excluding a role for Ssa1p and the other family members in their assembly.

pAPI Remains Unprotected in the Cytoplasm of $a1^{\Delta}a234$ Cells at the Restrictive Temperature—To further define the role of Ssa1p/Ssa2p in the targeting of pAPI to the vacuole, we investigated whether pAPI molecules were retained or not in the cytoplasm at the permissive and restrictive temperature. This is important since Ssa1p/Ssa2p are localized in the cytoplasm and it has been reported in a recent study that all the pAPI in the cell is within vesicles in a *Dssa1* mutant (25). For this purpose, the sensitivity of newly synthesized pAPI molecules to proteinase K was studied in $a1^{\Delta}a234$ spheroplasts pulsed for 10 min with [35 S]methionine/cysteine at 24 and 37 °C and then chased 2 min or 4 h at the corresponding temperature. The long chase period was adjusted to the slow processing of pAPI in spheroplasts at 24 °C, which amounted to 60–70% of the newly synthesized pAPI during a 4-h chase (not shown). The protection of labeled pAPI from proteinase K digestion in the absence or presence of detergent was analyzed in osmotically lysed spheroplasts by autoradiography after immunoprecipitation (see "Experimental Procedures" and the legend to Fig. 5). When lysates from $a1^{\Delta}a234$ spheroplasts were incubated at the permissive temperature, it was observed that between 2 min and 4 h after its synthesis nearly 85% of pAPI

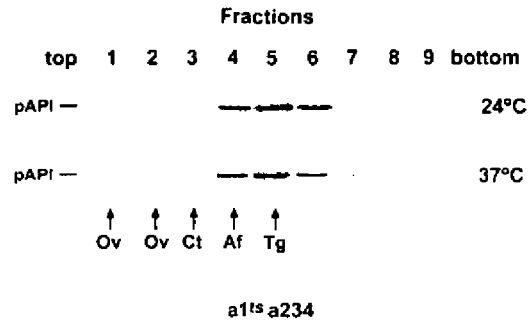


FIG. 4. Ssa1p is not involved in the assembly of pAPI into dodecamers. Extracts from $a1^{\Delta}a234\Delta ape1$ cells expressing API under the control of the GAL1–10 promoter and incubated for 4 h with galactose were fractionated by sedimentation velocity centrifugation using 20–50% glycerol gradients and the distribution of the API species through the gradients studied by Western blot using an anti-API polyclonal antibody. Molecular mass standards were ovalbumin (Ov, 45 kDa), catalase (Ct, 240 kDa), apoferritin (Af, 450 kDa), and thyroglobulin (Tg, 669 kDa).

was converted into iAPI (*i.e.* intermediate API) and mAPI. Moreover, in the absence of detergent, the majority of pAPI and iAPI was digested by proteinase K into the comparatively protease-resistant mAPI, whereas in its presence digestion was complete (Fig. 5A). It should be noted that no significant vacuolar disruption, that would have interfered with the protease protection assay, occurred during lysis of spheroplasts, as shown by the absence of mAPI in the immunoprecipitates obtained from spheroplasts chased for 2 min at the permissive temperature. When the experiment was performed with lysates from $a1^{\Delta}a234$ spheroplasts incubated at the restrictive temperature, we observed that 4 h after its synthesis the majority of pAPI remain unprocessed, the small amount of mAPI detected probably being generated by minor vacuolar breakage during the disruption of the spheroplasts by osmotic lysis. Moreover, all the pAPI was digested by the protease in the absence of detergent (Fig. 5A).

Analysis of the protease protection of CPY in a parallel experiment run under the conditions described for pAPI showed that, as expected, after 2 min of chase the CPY precursor (pCPY) transported through the secretory pathway was

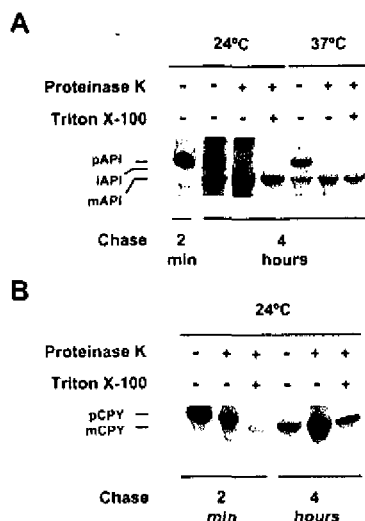


FIG. 5. pAPI remains unprotected in the cytoplasm of *a1^ha234* cells at the restrictive temperature. *a1^ha234* spheroplasts were metabolically labeled at 24 and 37 °C for 10 min with [³⁵S]methionine/cysteine and then chased for either 2 min or 4 h at the corresponding temperature. Osmotically produced lysates were then incubated at 4 °C for 30 min without or with 50 µg/ml proteinase K, in the absence or presence of 0.2% Triton X-100. Note the absence of mAPI after the 2-min chase, thus, indicating that no significant vacuolar disruption was produced during the spheroplasts lysis. API (A) and CPY (B) proteins were immunoprecipitated using specific antibodies, resolved by 10% SDS-PAGE, and analyzed by autoradiography. pCPY, precursor CPY; mCPY, mature CPY; iAPI, intermediate API.

protected from proteinase K in the absence of detergent, whereas it was digested into the protease-resistant mature form (mCPY) when detergent was added. Furthermore, after 4 h of chase, CPY was observed to migrate with the size corresponding to mCPY and to be resistant to the protease both in the absence or presence of detergent (Fig. 5B). These results were consistent with the entrance of pCPY in the secretory pathway concomitant with its synthesis and reassessed the validity of the protease protection assay as a valid technique to study the retention of pAPI in the cytoplasm.

Altogether these results indicated that a significant amount of the pAPI synthesized and chased at the permissive temperature remained unprotected in the cytoplasm long after its synthesis and that at the restrictive temperature in the absence of a functional Ssa1p protein, all the precursor retained in the cytoplasm was unprotected.

DISCUSSION

The results of studies on the transport of API to the vacuole are compatible with two models of transport that are not mutually exclusive. In the first model, API assembled into dodecamers is selectively wrapped by a double membrane sac that eventually fuses with the vacuole to unload the protein packed in the inner vesicles into the vacuolar lumen (9). The second model proposes that the precursor is translocated through the membrane of a transport intermediate or the vacuolar membrane (5).

We show here that Ssa1p and Ssa2p, the two constitutive chaperones involved in the folding, oligomerization, and targeting of proteins from the cytosol to such diverse organelles as ER (14, 26, 27), mitochondria, (28) and nucleus (29), interact specifically *in vitro* with the peptide that mimics the prepro-NH₂ extension of pAPI, an extension that is necessary and sufficient for the targeting of pAPI to the vacuole (11).

The predominance of the 70-kDa peptides among the few proteins retained by the prepro(API)-peptidyl affinity column

stresses the specificity of the interaction between the Ssa1p/Ssa2p and the prepro-NH₂ extension of pAPI. Nevertheless, when considering that chaperones often bind to exposed hydrophobic patches on incompletely folded proteins and that most of the peptide mimicking the pre-part and the pre-(Gly⁷) peptide are unfolded, the possibility that their *in vitro* interaction could be unspecific should be considered. With regard to this, it is important to note that the mean hydrophobicity per residue of nonpolar face in the pre-part (MEEQREGLEQLLKKTLQ) is only 0.28 (7) and that the pro-part (MLTVEPSKNNQIANEEKEKKNENSW) is even less hydrophobic. These observations make it unlikely that the interaction of the prepro-NH₂ extension with Ssa1p/Ssa2p is an artifact provoked by the physicochemical properties of the peptide.

We have shown that, in aqueous solution, only 24% of the peptide mimicking the pre-part and 1.7–2.4% of the pre-(Gly⁷) peptide fold into an α -helix (7). However, Ssa1p/Ssa2p are retained with similar efficiency by the prepro- and pre-(Gly⁷) pro-affinity columns, suggesting that either the motifs recognized by the chaperones are contained in the primary structure of the pre-part or in the pro-part. In addition, the recovery of the pAPI extracted from *a1^ha234* cells grown at 24 and 37 °C as a dodecamer upon centrifugation in glycerol gradients indicates that Ssa1p is not involved in its oligomerization.

The inhibition of the conversion of pAPI into mAPI in *a1^ha234* cells incubated at the restrictive temperature under either vegetative or nitrogen starvation conditions indicates that Ssa1p mediates the transport of pAPI to the vacuole under both conditions. This result is in contrast with recent observations by Satyanarayana *et al.* (25) who have reported that Ssa1p is not involved in the transport of pAPI to the vacuole under nitrogen starvation conditions favoring autophagocytosis.

The possibility that Ssa1p may play a role in engaging the properly folded precursor with the capture/transport machineries that operate in its transport to the vacuole should be considered. Wrapping of pAPI complexes by double membrane sacs might only occur after their interaction with the cytoplasmic chaperone, whereas if pAPI is translocated through the membranes of transport vesicles/vacuole the chaperone could interact with a specific membrane receptor. The demonstration that a significant amount of newly synthesized pAPI remains unprotected in the cytoplasm 4 h after its synthesis, at the permissive temperature, as shown by the protease protection assay, agrees with the results of previous studies (2) and seems to discard the existence of membrane barriers between pAPI and Ssa1p that could prevent their interaction, as indicated in a recent study (25). Furthermore, the complete digestion of the pAPI synthesized and chased for 4 h at the restrictive temperature, by proteinase K in the absence of detergent, indicates that the inactivation of Ssa1p inhibits the pAPI protection. This observation strongly suggests that the chaperone mediates the capture/downloading of pAPI into Cvt vesicles.

Acknowledgments—We thank Drs. E. Craig and G. Högenauer for kindly supplying the *a1-45* yeast strain and the anti-CPY antibody, respectively. We are also indebted to Dr. F. Portillo for helpful discussions.

REFERENCES

1. Klionsky, D. J., Cueva, R., and Yaver, D. S. (1992) *J. Cell Biol.* 119, 287–299
2. Scott, S. V., and Klionsky, D. J. (1995) *J. Cell Biol.* 131, 1727–1735
3. Scott, S. V., Hefner-Gravink, A., Morano, K. A., Noda, T., Ohsami, Y., and Klionsky, D. J. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93, 12304–12308
4. Harding, T. M., Hefner-Gravink, A., Thumm, M., and Klionsky, D. J. (1996) *J. Biol. Chem.* 271, 17621–17624
5. Seguí-Real, B., Martínez, M., and Sandoval, I. V. (1995) *EMBO J.* 14, 5476–5484
6. Oda, M. N., Scott, S. V., Hefner-Gravink, A., Caffarelli, A. D., and Klionsky, D. J. (1995) *J. Cell Biol.* 132, 999–1010
7. Martínez, E., Jiménez, M. A., Seguí-Real, B., Vandekerckhove, J., and

- Sandoval, I. V. (1997) *J. Mol. Biol.* **267**, 1124-1138
8. Kim, J., Scott, S. V., Oda, M. N., and Klionsky, D. J. (1997) *J. Cell Biol.* **137**, 609-618
9. Scott, S. V., Baba, M., Ohsumi, Y., and Klionsky, D. J. (1997) *J. Cell Biol.* **138**, 37-44
10. Baba, M., Osumi, M., Scott, S. V., Klionsky, D. J., and Ohsumi, Y. (1997) *J. Cell Biol.* **139**, 1687-1695
11. Martinez, E., Segui-Real, B., Sillies, E., Mazon, M. J., and Sandoval, I. V. (1999) *Mol. Microbiol.* **33**, 52-62
12. Becker, J., Walter, W., Yan, W., and Craig, E. A. (1996) *Mol. Cell. Biol.* **16**, 4378-4386
13. Unno, K., Kishido, T., Hosaka, M., and Okada, S. (1997) *Biol. Pharmacol. Bull.* **20**, 1240-1244
14. Kim, S., Schilke, B., Craig, E. A., and Horwich, A. L. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**, 12860-12865
15. Baudin, A., Ozier-Kalogeropoulos, O., Denouel, A., Lacroix, F., and Cullin, C. (1993) *Nucleic Acids Res.* **21**, 3329-3330
16. Wach, A., Brachat, A., Pohlmann, R., and Philippsen, P. (1994) *Yeast* **10**, 1793-1808
17. Thomas, B. J., and Rothstein, R. (1989) *Cell* **56**, 619-630
18. Sikorski, R. S., and Hieter, P. (1989) *Genetics* **122**, 19-27
19. Sherman, F., Fink, G. R., and Hicks, J. B. (1986) *Laboratory Course Manual for Methods in Yeast Genetics*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY
20. Ito, H., Fukuda, Y., Murata, K., and Kimura, A. (1983) *J. Bacteriol.* **153**, 163-168
21. Sambrook, J. E., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY
22. Gevaert, K., Demol, H., Sklyarova, T., Vandekerckhove, J., and Houthaeve, T. (1998) *Electrophoresis* **19**, 909-917
23. Mann, M., and Wilm, M. (1994) *Anal. Chem.* **66**, 4390-4399
24. Griffin, P. R., MacCoss, M. J., Eng, J. K., Blevins, R. A., Aaronson, J. S., and Yates, J. R., 3rd. (1995) *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **9**, 1546-1551
25. Satyanarayana, C., Schroder-Kohne, S., Craig, E. A., Schu, P. V., and Horst, M. (2000) *FEBS Lett.* **470**, 232-238
26. Arnold, C. E., and Wittrup, K. D. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 30412-30418
27. McClellan, A. J., Endres, J. B., Vogel, J. P., Palazzi, D., Rose, M. D., and Brodsky, J. L. (1998) *Mol. Biol. Cell* **9**, 3533-3545
28. Endo, T., Mitsui, S., Nakai, M., and Roise, D. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**, 4161-4167
29. Liu, Y., Liang, S., and Tartakoff, A. M. (1996) *EMBO J.* **15**, 6750-6757

Yol082p, a Novel CVT Protein Involved in the Selective Targeting of Aminopeptidase I to the Yeast Vacuole*

Received for publication, February 14, 2001, and in revised form, April 27, 2001
Published, JBC Papers in Press, May 29, 2001, DOI 10.1074/jbc.M101438200

Regina Leber†§¶, Eduardo Siles‡§¶¶, Ignacio V. Sandoval‡¶¶, and María J. Mazón‡§§

From the ‡Instituto de Investigaciones Biomédicas Alberto Sols, Consejo Superior de Investigaciones Científicas-Universidad Autónoma de Madrid, 28029 Madrid, Spain and the §Centro de Biología Molecular Severo Ochoa, Consejo Superior de Investigaciones Científicas-Facultad de Ciencias Universidad Autónoma de Madrid, 28049 Madrid, Spain

The yeast vacuolar enzyme aminopeptidase I (API) is synthesized in the cytoplasm as a precursor (pAPI). Upon its assembly into dodecamers, pAPI is wrapped by double-membrane saccular structures for its further transport within vesicles that fuse with the vacuolar membrane and release their content in the vacuolar lumen. Targeting of API to the vacuole occurs by two alternative transport routes, the cvt and the autophagy pathways, which although mechanistically similar specifically operate under vegetative growth or nitrogen starvation conditions, respectively. We have studied the role of Yol082p, a protein identified by its ability to interact with API, in the transport of its precursor to the vacuole. We show that Yol082p interacts with mature API, an interaction that is strengthened by the amino extension of the API protein. Yol082p is required for targeting of pAPI to the vacuole, both under growing and short term nitrogen starvation conditions. Absence of Yol082p does not impede the assembly of pAPI into dodecamers, but precludes the enclosure of pAPI within transport vesicles. Microscopy studies show that during vegetative growth Yol082p is distributed between a cytoplasmic pool and a variable number of 0.13–0.27- μ m round, mobile structures, which are no longer observed under conditions of nitrogen starvation, and become larger in cells expressing the inactive Yol082 Δ C32p, or lacking Apg12p. In contrast to the autophagy mutants involved in API transport, a Δ yol082 strain does not lose viability under nitrogen starvation conditions, indicating normal function of the autophagy pathway. The data are consistent with a role of Yol082p in an early step of the API transport, after its assembly into dodecamers. Because Yol082p fulfills the functional requisites that define the CVT proteins, we propose to name it Cvt19.

leucine aminopeptidase I (API)¹ is synthesized in the cytoplasm as a precursor (pAPI) (1) and delivered to the vacuole by one of two alternative routes that operate under distinct physiological conditions: the cytoplasm to vacuole targeting (Cvt), in nutrient-rich conditions, and the autophagy (Apg) pathway, under starvation conditions (2). The Cvt pathway is constitutive and biosynthetic, while autophagy is nonselective and degradative and is induced to survive periods of nutrient limitation (3). However, the two pathways share many molecular components and both involve sequestration by double-membrane saccular structures of unknown origin that capture the load, close into vesicles, and then fuse with the vacuole (4). A major difference between these pathways appears to be the size and content of the transport vesicles. The Cvt vesicles exclude cytoplasm and are smaller than autophagosomes that engulf bulk cytoplasm and even organelles (2). Strikingly, despite all these differences, targeting of API to the vacuole is specific and saturable, both in vegetative growth conditions and under nitrogen deprivation (3), although the molecular details of its selective recognition and capture remain essentially unknown. Previous studies have shown that pAPI recognition by the transport machinery involves its prepro-amino extension (5, 6) and cytoplasmic chaperones of the Ssa family (7, 8). Furthermore, the amino extension is necessary and sufficient to target the reporter protein GFP to the vacuole (9). In this study we report that Yol082p, a protein shown to interact physically with pAPI in a two-hybrid screening performed with the whole yeast genome (10), mediates API loading into transport vesicles and targeting to the vacuole. We also show that Yol082p interacts with API by a process that does not only involve the prepro-amino extension but also the mature part of the API protein. Yol082p is distributed between the cytoplasm and distinct round mobile structures.

In the yeast *Saccharomyces cerevisiae* the vacuolar hydrolase

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Yeast Strains and Media—The *S. cerevisiae* strains used in this work, BY4741 (*MAT a his3 Δ 1 leu2 Δ 0 met15 Δ 0 ura3 Δ 0*), and its isogenic strain deleted for *YOL082w* (*MAT a his3 Δ 1 leu2 Δ 0 met15 Δ 0 ura3 Δ 0 yol082w::kanMX4*), were obtained from Euroscarf (European *S. cerevisiae* Archive for Functional Analysis). Disruption of *APG12* in the BY4741 background was produced by one-step targeted integration (11) with a heterologous *HIS3* marker flanked by 46-base pair target guide sequences (12). The control strain carrying a *PEP4* gene disruption was constructed by integration of a *pep4 Δ ::HIS3* disruption cassette, gift of Dr. H. Wolf, in the *PEP4* locus of strain W303-1B (*MAT a ade2-1 his3-11, 15 leu2-3, 112 trp1-1 ura3-1 can1-100*) as described in Ref. 9. In

* This work was supported by Grant FMRX-CT96-0058 from the European Community (to I. V. S. and M. J. M.) and by grants from the Comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología (94-0035 (to I. V. S.)) and the Fondo de Investigaciones Sanitarias (98/279) and the Dirección General de Enseñanza Superior e Investigación Científica (PB97-0054 (to M. J. M.)). The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

§ These authors contributed equally to this work.

† Supported by Program FMRX-CT96-0058.

¶ Supported by Program BMH4-CT96-0010.

¶¶ Supported by the Fundación Ramón Areces.

§§ To whom correspondence should be addressed: Instituto de Investigaciones Biomédicas Alberto Sols, Consejo Superior de Investigaciones Científicas-Universidad Autónoma de Madrid, 28029 Madrid, Spain. Tel.: 34-91-585-4618; Fax: 34-91-585-4587; E-mail: mjmazon@iib.uam.es.

¹ The abbreviations used are: API, yeast vacuolar leucine aminopeptidase I; pAPI, API precursor; mAPI, mature API; Apg, autophagy; Cvt, cytoplasm to vacuole targeting; GFP, green fluorescent protein; YR, Yol082p round structure; PCR, polymerase chain reaction; ECL, enhanced chemiluminescence; Pipes, 1,4-piperazinediethanesulfonic acid; CPY, carboxypeptidase Y; PAGE, polyacrylamide gel electrophoresis.

all experiments yeast cells were grown at 30 °C in synthetic minimal medium: 0.67% yeast nitrogen base without amino acids, 2% glucose (SD), 2% raffinose (SRaf), or 2% galactose (SGal), and the appropriate auxotrophic requirements added at 100 µg/ml. Synthetic minimal medium containing 2% glucose and 0.17% yeast nitrogen base without amino acids and ammonium sulfate, SD(-N), was used for nitrogen starvation experiments.

Plasmid Constructions—The plasmid pGAL1-YOL082 expressing the *YOL082w* gene under the control of the inducible *GAL1* promoter in the pYES2.0 vector (Invitrogen) was constructed as follows: DNA of the *YOL082* coding region containing universal termini with *EcoRI* and *PvuII* sites at the 5' end and an *SmaI* site at the 3' end was amplified by PCR using Universal Yeast open reading frame primers (Research Genetics, Inc.). The polymerase chain reaction product was ligated into TOPO-TA Cloning[®] (Invitrogen) vector to give TOPO-YOL082. The *EcoRI-SmaI* fragment containing *YOL082* was then cloned into the pYES2.0 vector. For the NH₂-terminal fusion pGFP-YOL082, the *YOL082* coding region was PCR-amplified from TOPO-YOL082 using the forward Universal Yeast open reading frame primer and a reverse primer introducing a *XhoI* site 3' to the stop codon. *PvuII-XhoI*-digested PCR product was then cloned into *SmaI-XhoI*-digested pGFP-N-FUS (13) generating an in frame fusion. The plasmid pYOL082ΔC32-GFP expressing a truncated version of *Yol082p* lacking 32 residues in its carboxyl terminus was created by cloning an *EcoRI-ClaI* fragment of TOPO-YOL082 (residues 1–383 of *Yol082p*) into pGFP-C-FUS (13) creating an in frame COOH-terminal fusion. Plasmid pYOL082ΔC32 was derived from pYOL082ΔC32-GFP by excising a *Sall-Sall* fragment containing the GFP coding region. The resulting plasmids, pGAL1-YOL082, pGFP-YOL082, pYOL082ΔC32-GFP, and pYOL082ΔC32, were used to transform the BY4741, *Δyol082*, and *Δapg12* strains using the lithium acetate procedure (14).

The bait plasmid encoding precursor API fused in frame to the Gal4p DNA-binding domain was constructed as follows: the API open reading frame was PCR-amplified from pEMBLyex4-API (5) with a forward primer, 5'-GGTACCCCGGGAACCTCTAGA-3', which incorporated an *SmaI* site, and a reverse primer, 5'-CGAATTCATCGTCGACTGATCTCC-3', which incorporated a *Sall* site. The *SmaI-Sall* fragment was then cloned into pGBT9 (CLONTECH) to create pGBT9-pAPI (amino acids 1–507). The API region encoding the prepro-amino extension (amino acids 1–44) was cloned using the same forward primer and a reverse primer, 5'-GTGCTCGAGGATCCACCAACG-3', creating a *BamHI* site. The corresponding *SmaI-BamHI* fragment was inserted into pGBT9 to generate pGBT9-preproAPI. The mature API coding region (amino acids 54–514) was amplified with a forward primer, 5'-TATGAGGATAGTCGACAGGAATTC-3', generating a *Sall* site and a reverse universal primer; the resulting PCR product was cloned into pUC18, and a *Sall-PstI* fragment was cloned into pGBT9 to give pGBT9-mAPI. To construct pACT2-YOL082 expressing the complete *Yol082p* fused in frame to the Gal4p activation domain, the *YOL082* coding region was amplified from TOPO-YOL082 using a forward primer, 5'-CTGACCACCATGGACAACCTCAAAG-3', which added an *NcoI* site and a universal reverse primer. An *NcoI-SmaI* fragment of the PCR product was then cloned into *NcoI-SmaI*-digested pACT2.

Two-hybrid Assay—The strain PJ69-4 (*MAT a trp1-901 leu2-3, 112 ura3-52 his3-200 LYS2::GAL1-HIS3 met2::GAL7-LacZ GAL2-ADE2 gal4Δ gal80Δ*) (15) was sequentially transformed with the bait and prey plasmids. Transformants were selected on Trp Leu plates and then tested for growth on Ade Trp Leu plates and on His Trp Leu plates containing 5 mM 3-amino-1,2,4-triazole. Interaction was quantified by measuring β-galactosidase activity (16) in crude extracts.

Studies on the Processing of the pAPI into mAPI—To determine pAPI and mAPI protein levels, BY4741 and *Δyol082* cells were grown overnight in SD medium to 1 OD₆₀₀. Strains tested under nitrogen starvation conditions were then washed twice with distilled water and incubated in SD(-N) for different time periods. Cells were harvested and crude cell extracts prepared with glass beads in cold 50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 5 mM EDTA and protease inhibitors (1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride and pepstatin, aprotinin, and leupeptin at 1 µg/ml each). The extracts were centrifuged at 4 °C for 5 min at 500 × *g* to eliminate cell debris and 10 µg of protein studied by Western analysis with a rabbit polyclonal anti-API antibody (5) or a rabbit polyclonal antibody against the amino extension of pAPI (9), using the ECL detection system (Amersham Pharmacia Biotech). Cells transformed with pGAL1-YOL082 were grown in SRaf medium and induced for different time periods in SGal, prior to harvesting and preparation of the crude cell extracts. Cells transformed with pGFP-YOL082, pYOL082ΔC32-GFP, and pYOL082ΔC32 were grown in low methionine-SD (10 µg/ml)

to control the expression of the fusion protein from the *MET25* promoter.

Cell Viability Studies—To examine the survival of the different yeast strains under nitrogen starvation conditions, cells were grown to 1 OD₆₀₀ in SD medium, washed once with distilled water, and resuspended in SD(-N). At different times aliquots were removed, and the appropriate dilutions were plated in triplicate onto YPD (1% yeast extract, 2% peptone, 2% glucose) plates.

Analysis of API Dodecamers by Sedimentation Velocity Centrifugation—Wild-type and *Δyol082* cells grown in SD 1 medium overnight to 1 OD₆₀₀ were harvested and crude cell extracts prepared with glass beads as described above. The extracts were fractionated by rate-velocity centrifugation on a glycerol gradient (20–50%) (17) and the gradient fractions scrutinized for API by Western blot using the anti-API antibody and the ECL technique.

Protease Protection Assays—Wild-type and *Δyol082* cells grown to 1 OD₆₀₀ in SD medium were harvested and spheroplasted by treatment with Zymolyase 20-T (United States Biological). Briefly, cells were incubated in 0.1 M Tris/SO₄ buffer, pH 9.4, containing 20 mM dithiothreitol for 20 min at 30 °C, collected, and treated with 0.2 mg/ml zymolyase in 1.2 M sorbitol, 20 mM KH₂PO₄, pH 7.4, for 30 min at 30 °C. Spheroplasts were adjusted to 15 OD₆₀₀/ml with SL medium (1 M sorbitol, 1% glucose, 1% proline, 0.17% YNB without amino acids and ammonium sulfate, with the appropriate auxotrophic requirements) (18) and 1 ml preincubated for 5 min at 30 °C and metabolically labeled for 10 min using 100 µCi of [³⁵S]methionine/cysteine (Amersham Pharmacia Biotech) per OD₆₀₀. Labeled spheroplasts were then diluted 10-fold in SL medium containing 8 mM methionine, 4 mM cysteine, and 0.2% yeast extract and chased for 2 min or 2 h. Chases were stopped by incubation for 2 min with 10 mM NaN₃ and the spheroplasts harvested and washed with SL medium. Lysates from spheroplasts were prepared by osmotic lysis in 1 ml of 200 mM sorbitol, 5 mM MgCl₂, 20 mM Pipes, pH 6.8 (lysis buffer) for 20 min at 4 °C. Unlysed spheroplasts were removed by centrifugation for 2 min at 500 × *g*. Lysates were treated at 4 °C for 30 min with 50 µg/ml proteinase K (Life Technologies, Inc.) in the absence and presence of 0.2% Triton X-100. The proteolytic digestion was stopped with a mixture of protease inhibitors (5 mM EDTA, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, and pepstatin, aprotinin, and leupeptin at 1 µg/ml each). Protein was then precipitated with cold 10% trichloroacetic acid, using 100 µg/ml bovine serum albumin as carrier, washed with acetone, and the API in the resuspended pellets immunoprecipitated as described previously (7), resolved by 10% SDS-PAGE, and studied by autoradiography.

Subcellular Fractionation and Membrane Flotation Analysis—To biochemically determine the subcellular distribution of the GFP-Yol082p, wild-type and *Δyol082* cells transformed with the pGFP-YOL082 plasmid were grown in low methionine-SD medium, and 15 OD₆₀₀ cell equivalents were harvested, spheroplasted, and lysed as described above. The lysates were precleared by centrifugation at 500 × *g* for 5 min to remove unlysed spheroplasts and the supernatants subjected to centrifugation at 17,000 × *g* for 10 min at 4 °C to give pellet and supernatant fractions (P17 and S17). The S17 fraction was subjected to further centrifugation at 100,000 × *g* for 30 min at 4 °C resulting in pellet and soluble fractions (P100 and S100). The P17 and P100 fractions were washed and resuspended in lysis buffer. Protein from all fractions was precipitated with trichloroacetic acid, solubilized with Laemmli buffer, resolved by 8% SDS-PAGE, and analyzed by Western blot with anti-GFP antibody (CLONTECH).

Membrane flotation experiments were performed by the method described by Noda *et al.* (19), modified as follows: precleared spheroplasts lysates were centrifuged for 5 min at 5,000 × *g* and the pellet, resuspended in 100 µl of 15% Ficoll prepared in lysis buffer, overlaid with 1.2 ml of 13% Ficoll and then with 100 µl of 2% Ficoll, and centrifuged for 10 min at 4 °C at 17,000 × *g*. Fractions of 230 µl were collected, subjected to trichloroacetic acid precipitation, resolved by 8% SDS-PAGE, and blots probed with the anti-API antibody. Stripped blots were tested for CPY with specific antibodies.

Microscopy Studies—Cells expressing GFP-Yol082p or *Yol082ΔC32p*-GFP were grown to 1.2 OD in low methionine-SD medium and when required incubated for 2 h in SD(-N) medium. Upon concentration by low speed centrifugation the cells were spread thin on glass slides, air-dried, and studied by fluorescence microscopy using a Radiance 2000 confocal microscope (Bio-Rad).

RESULTS

***Yol082p* Interacts with API in a Two-hybrid Assay**—*Yol082p* was identified as a protein able to interact with API in a

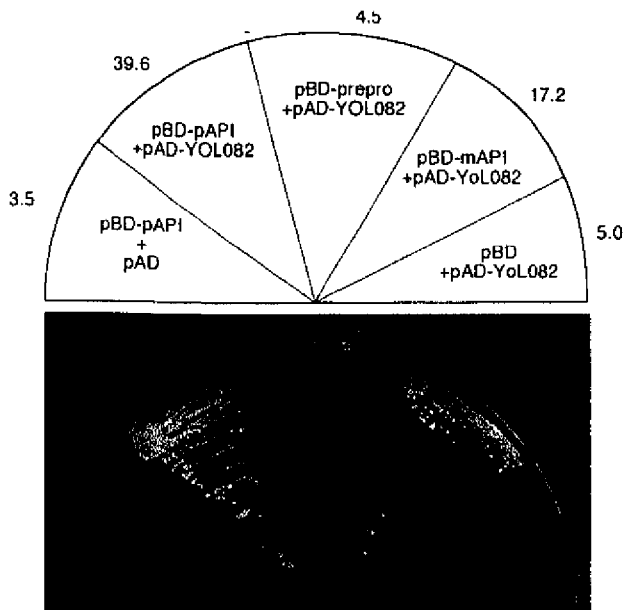


FIG. 1. Two-hybrid interaction between API and Yol82p. Growth of the PJ69-4 strain transformed with the indicated constructs, on SD-Ade-His-Trp-Leu + 5 mM 3-aminotriazole. For clarity, pGBT9 and pACT2 are named with the acronyms pBD (binding domain) and pAD (activating domain), respectively. None of the empty vectors supported growth when co-transformed with any of the constructs. Growth was scored after 3 days incubation at 30 °C. The β -galactosidase activity (milliunits/mg of protein) was measured in crude extracts, and the digits indicate the mean of the levels measured in three independent transformants.

comprehensive analysis of protein-protein interactions of the yeast proteome using the two-hybrid system (10). The Yol82p protein has a predicted molecular mass of 47.5 kDa and shows significant homology, 33% identity, to another *S. cerevisiae* putative protein of unknown function, referred to as Yol83p. No other homologues were found in the data bases. Analysis of the predicted sequence of Yol82p suggests that it is a hydrophilic protein with no predictable transmembrane domains. The null mutant of *YOL082w*, which as described was viable (20), showed wild-type growth rate in SD medium with a doubling time of 150 min for both wild-type and $\Delta yol082$ strains, indicating that Yol82p function is not required for vegetative growth. To further characterize its interaction with API, Yol82p was fused in frame with the Gal4p activation domain carried in the pACT2 vector and its interaction with the pre-amino extension of API, pAPI and mAPI, separately cloned into the bait plasmid pGBT9, studied using the two-hybrid system. Yol82p did not interact with the prepro domain, but interacted with mAPI, as shown by the ability of the co-transformed cells to grow on selective plates (Fig. 1). The interaction with mAPI was enhanced by the presence of the amino extension as evidenced by its stronger interaction with pAPI (Fig. 1). The specificity of the above interactions was confirmed by the observation that none of the constructions co-transformed with the empty vectors allowed growth in the restrictive medium.

Yol82p Is Involved in Vacuolar API Import/Processing—The interaction of API with Yol82p led us to study whether it was involved in the transport of API to the vacuole. To test this, we first compared the vacuolar processing of API in a yeast strain carrying a deletion of the *YOL082w* gene with that in its isogenic wild-type strain BY4741. The results showed that in $\Delta yol082$ cells the majority of API is in its precursor form pAPI (Fig. 2A), both in cells vegetatively growing or starved of nitrogen for 2 h. In contrast, in the BY4741 strain, the entire API

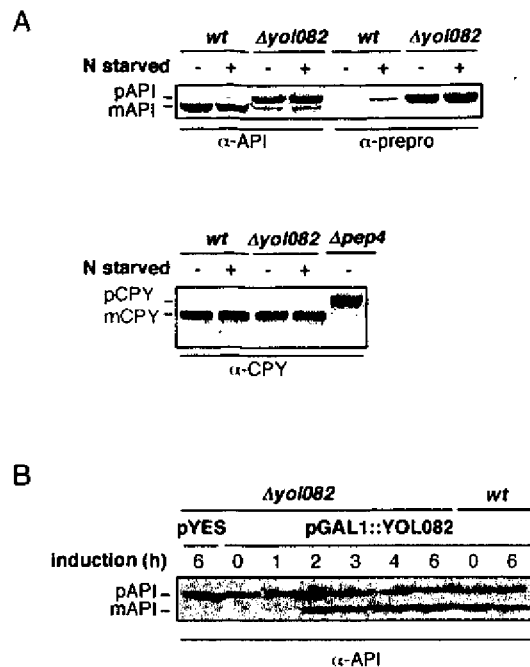


FIG. 2. Vacuolar processing of API in $\Delta yol082$ cells. A, cells of the wild-type (*wt*) and $\Delta yol082$ mutant strains were grown to logarithmic phase in SD medium and either collected or starved for 2 h in SD(-N) before harvesting. Crude extracts were resolved by SDS-PAGE and their blots probed with anti-API, anti-prepro-API, and anti-CPY antibodies. B, cells of the mutant strain $\Delta yol082$ expressing Yol82p from a multicopy plasmid (pYES2.0), under the control of the *GAL1* promoter (pGAL1-YOL082), were grown to logarithmic phase in SRAf medium and then transferred to SGal. Cell samples were taken at the indicated times of induction with galactose, extracted, and their blots probed with anti-API antibody. Also shown are immunoblots of crude extracts from mutant cells transformed with empty pYES2.0 and induced for 6 h in SGal and from wild-type cells transformed with pGAL1-YOL082 and induced for 0 and 6 h in SGal.

detected was in the processed form, mAPI. Furthermore, CPY, a vacuolar protease that is transported to the vacuole through the secretory pathway, was correctly processed in wild-type and mutant cells, indicating normal functioning of the secretory pathway in these strains. These results indicated that Yol82p was required for transport of pAPI to the vacuole and that this requirement was not bypassed by the 2-h period of nitrogen starvation. The involvement of Yol82p in the transport of pAPI to the vacuole was then directly tested by studying the conversion of pAPI into mAPI in $\Delta yol082$ cells transformed with a multicopy plasmid carrying the *YOL082w* gene under the control of the *GAL1* promoter (Fig. 2B). It was observed that these cells gradually converted pAPI into mAPI as they were incubated in galactose from 0 to 6 h. The overexpression of Yol82p in the wild-type background did not interfere with the processing of pAPI. This was interesting because overexpression of Cvt9p, a protein that appears to function primarily under vegetative growth conditions, has been shown to produce a dominant negative phenotype for API import when overexpressed (21). Control mutant cells transformed with the empty vector were, on the other hand, unable to process the precursor. Altogether these results clearly showed that the conversion of pAPI into mAPI, an event associated with the transport of pAPI from the cytoplasm to the vacuole, is facilitated by Yol82p.

Conversion of pAPI into mAPI Becomes Yol82p-independent upon Prolonged Periods of Nitrogen Starvation—In yeast, nitrogen deprivation induces a degradative process known as

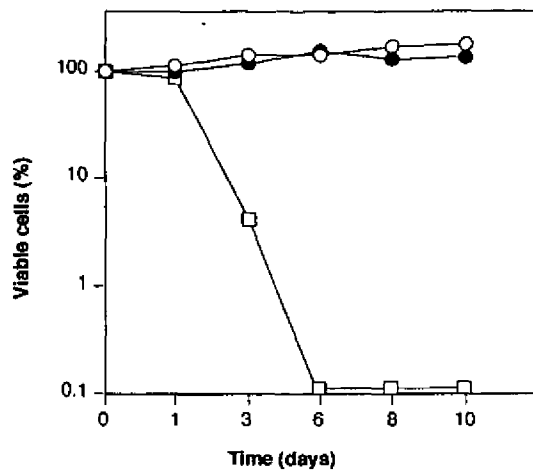


FIG. 3. *Yol082p* is not essential for maintenance of viability under nitrogen starvation conditions. Cells of the wild-type (open circles) and the mutant $\Delta yol082$ (filled circles) and $\Delta apg12$ (squares) strains vegetatively growing in SD medium were washed with water, transferred to SD(-N) medium, and incubated at 30 °C. At the times indicated, the viability of cells was examined as described under "Experimental Procedures."

autophagocytosis. During autophagocytosis, bulk cytoplasm and organelles are packaged into double-membrane vesicles, termed autophagosomes, for further delivery to the vacuole. Under these conditions the majority of pAPI is targeted to the vacuole by autophagosomes (Apg pathway), but the maturation kinetics of pAPI is indistinguishable from that recorded under growing conditions (3). This is in contrast to the slow degradation of cytoplasmic markers (3), thus suggesting API transport by the Apg pathway remains selective. Because the Cvt and the Apg pathways share many of their molecular components (3, 22), we, therefore, investigated the role of *Yol082p* in the transport of pAPI to the vacuole by the Apg pathway.

One of the distinctive phenotypes of the *apg* mutants is their reduced viability during starvation. We, therefore, compared the viability of wild-type and $\Delta yol082$ cells in SD(-N) medium with that of a $\Delta apg12$ mutant strain, a mutant defective in autophagocytosis and sensitive to nitrogen starvation (23). We observed no loss of viability in the wild-type and $\Delta yol082$ cells during 10 days of nitrogen starvation, while $\Delta apg12$ cells progressively lost viability during the incubation (Fig. 3). We interpreted this difference as an indication that *Yol082p* was not essential for autophagy. This result was somewhat surprising, since, as described above (see Fig. 2A), we found that API was not processed when the mutant cells were starved of nitrogen for 2 h. Therefore, we studied the effect of extending the nitrogen starvation period on the processing of pAPI. For this purpose, $\Delta yol082$ cells were starved of nitrogen for 12, 14, 16, 18, and 24 h and the conversion of pAPI into mAPI analyzed and compared with that in wild-type and $\Delta apg12$ cells. It was observed that the extension of the starvation caused the slow conversion of pAPI into mAPI, with as much as 15% of the precursor being processed in the first 12 h and 35% in 24 h. This observation was in contrast with the inability of the $\Delta apg12$ cells to process pAPI under the same conditions (Fig. 4). We interpreted these results as evidence that under prolonged nitrogen starvation conditions pAPI was passively transported to the vacuole through the autophagy pathway.

pAPI Remains in the Cytoplasm of $\Delta yol082$ Cells—To characterize the transport step blocked in $\Delta yol082$ cells, we first examined the assembly of pAPI into dodecamers, an event that precedes its wrapping by the saccular structures and its tar-

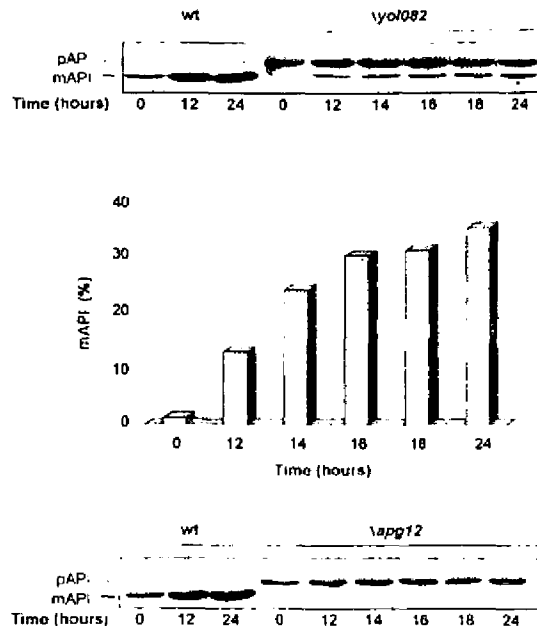


FIG. 4. *Yol082p* is not required for vacuolar import and processing of pAPI under prolonged nitrogen starvation. Cells of the wild-type and the mutant $\Delta yol082$ and $\Delta apg12$ strains growing vegetatively in SD medium were washed with water and then incubated in SD(-N) medium for the indicated number of hours. Blots from the cell crude extracts were probed with the anti-API antibody. The conversion of pAPI into mAPI in $\Delta yol082$ cells was quantitated by scanning the blot shown in the upper panel.

geting to the vacuole (17). For this purpose, the assembly state of pAPI in $\Delta yol082$ cells was studied by examining its mobility in glycerol gradients (Fig. 5). We observed that pAPI migrated as the pAPI dodecamers extracted from wild-type cells. It was, therefore, concluded that *Yol082p* was not involved in API oligomerization.

To study whether pAPI was captured by cvt vesicles in $\Delta yol082$ cells, we compared its recovery with membrane fractions prepared by differential centrifugation of wild-type and $\Delta yol082$ cells on Ficoll gradients (Fig. 6). For this purpose, osmotic lysates obtained from spheroplasted wild-type and mutant cells were centrifuged at 5,000 $\times g$ and the resulting pellets subjected to flotation in Ficoll as described under "Experimental Procedures." Upon flotation on Ficoll, membrane-associated proteins are recovered with the light-density fractions, soluble proteins with the denser ones, and large protein complexes with the pellet (18). As expected, most of the API extracted from the wild-type cells floated with the membranes (F1), whereas the majority of the pAPI extracted from $\Delta yol082$ cells, which remained as pAPI, was recovered with the pellet (F7) and a small percentage (10%) with the membranes. On the other hand, under these same conditions the CPY extracted from $\Delta yol082$ cells was recovered with the membranes, a result consistent with its expected ability to reach the vacuole.

The floating of a small part of pAPI with the membranes from $\Delta yol082$ cells led us to study whether it was sequestered within vesicles. For this purpose, spheroplasts prepared from wild-type and $\Delta yol082$ cells were pulse-labeled for 10 min with [³⁵S]methionine/cysteine and chased for 2 min or 2 h in medium without radioactivity. Then, the lysates from spheroplasts were incubated at 4 °C for 30 min without or with 50 μ g/ml proteinase K in the absence or presence of Triton X-100, prior to immunoprecipitation with the anti-API antibody. It was observed that pAPI remained fully accessible to the protease in the absence of detergent, during the 2-h chase period

FIG. 5. Yol082p is not involved in the assembly of pAPI into dodecamers. Extracts from wild-type and *Yol082* cells were fractionated by sedimentation velocity centrifugation using a 20–50% glycerol gradient and the distribution of the pAPI species studied by Western blot on the gradient fractions using the anti-API antibody. Molecular mass standards were ovalbumin (*Ovo*, 45 kDa), catalase (*Cat*, 240 kDa), apoferritin (*Apo*, 450 kDa), and thyroglobulin (*Thy*, 669 kDa).

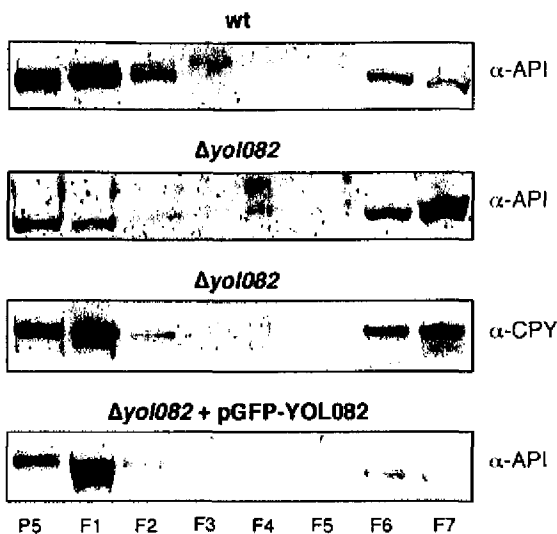
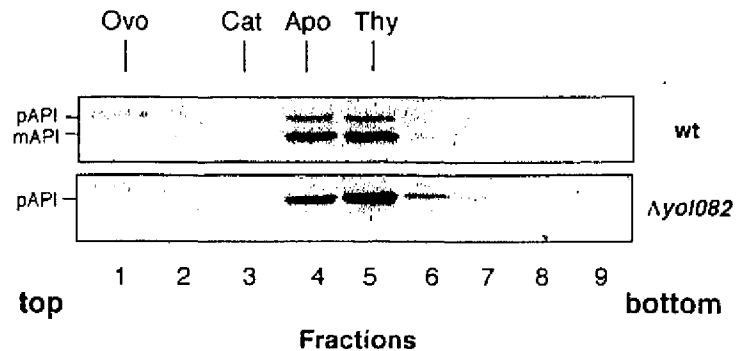


FIG. 6. Loss of API from the vacuole-rich fraction obtained from *Yol082* cells is restored by GFP-Yol082p. Spheroplasts from wild-type cells, and from *Yol082* cells transformed or not with pGFP-YOL082, were lysed osmotically, precleared, centrifuged for 10 min at 4 °C at 5,000 × *g*, and the pellets (P5) further fractionated by differential centrifugation on a Ficoll step gradient as described under "Experimental Procedures." An aliquot from P5, the gradient fractions (F1–F6) and the gradient pellet (F7) were resolved by SDS-PAGE and analyzed by Western blot, first with the anti-API antibody and then, after stripping the blots, with the anti-CPY antibodies.

(Fig. 7). This result indicated that pAPI is not sequestered within vesicles and suggests that the population of pAPI that floats with membranes is probably associated with open membrane structures or, less likely, bound to the surface of vesicles.

GFP-Yol082p Rescues the Conversion of pAPI into mAPI in *Yol082* Cells—To further learn about the role of Yol082p in API transport and its cellular distribution, we constructed a fusion protein in which the GFP was fused in frame to the amino end of Yol082p. Next, GFP-Yol082p was expressed in the *Yol082* mutant cells and its ability to convert pAPI into mAPI studied. The production of mAPI species in these cells indicated that GFP-Yol082p was functional *in vivo* (Fig. 8). The complementation of the defect in pAPI processing was, however, not observed when GFP was fused to the carboxyl end of Yol082ΔC32p, a mutant protein developed by deleting the last 32 residues of Yol082p. Moreover, when expressed in wild-type cells Yol082ΔC32p-GFP inhibited the processing of pAPI. These results and the inability of Yol082ΔC32p to complement the defective processing of pAPI in *Yol082* cells supported the idea that Yol082ΔC32p and Yol082ΔC32p-GFP were inactive, but correctly localized.

GFP-Yol082p Rescues the Association of API with Mem-

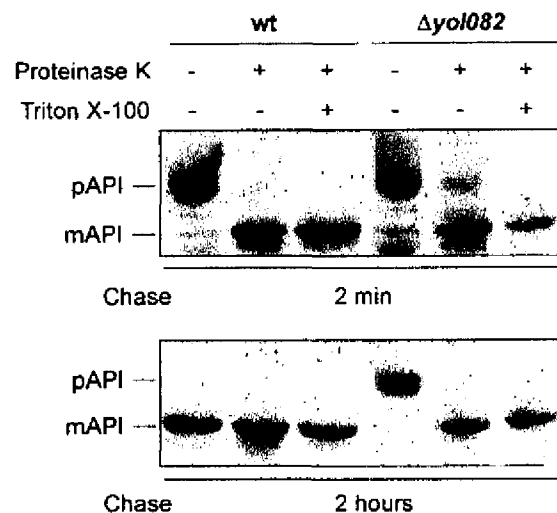


FIG. 7. pAPI remains protease-accessible in *Yol082* extracts. Spheroplasts from cells of the wild-type and the *Yol082* mutant strain were metabolically labeled for 10 min using [³⁵S]methionine/cysteine and then chased for either 2 min or 2 h. After their disruption by osmotic shock the resulting lysates were incubated at 4 °C for 30 min without or with 50 μg/ml proteinase K, in the absence or presence of 0.2% Triton X-100. Radiolabeled API protein was immunoprecipitated using the anti-API antibody conjugated to protein A-Sepharose and the precipitates resolved by SDS-PAGE and analyzed by autoradiography.

branes—To further examine whether Yol082p was required for the association of API with membranes, we studied the flotation of the API contained in extracts from *Yol082* cells transformed with pGFP-YOL082 on Ficoll gradients (Fig. 6). The recovery of API as mAPI with the membrane-enriched fractions (F1) indicated that GFP-Yol082p was able to rescue the association of API with membranes as well as its processing in the vacuole. This result, together with the recovery of the API extracted from untransformed *Yol082* cells with the pellet fraction (F7), as pAPI, strongly suggested that Yol082p plays a critical role in the wrapping of pAPI by membranes.

GFP-Yol082p Accumulates in Round, Mobile Cytoplasmic Structures—The subcellular distribution of GFP-Yol082p was investigated by studying its partition between fractions from spheroplasted *Yol082* cells obtained by differential centrifugation (data not shown). It was observed that ~15% of the protein sedimented at 17,000 × *g*, with the rest remaining soluble even after centrifugation for 1 h at 100,000 × *g*.

To gain further insight into the localization of Yol082p, we studied, by confocal microscopy, the distribution of GFP-Yol082p in smears from wild-type and *Yol082* cells (Fig. 9). The study revealed that GFP-Yol082p was distributed between the cytoplasm and a variable number of round structures, hereon referred to as YR structures (Yol082p Round struc-

tures), with an average size between 0.13 and 0.27 μm . These structures were not detected when wild-type or mutant cells were transformed with the empty plasmid pGFP-N-FUS. Furthermore, incubation of the cells for 2 h in SD(-N) medium to activate the autophagy pathway resulted in loss of the YR structures from most of the cells. On the contrary, when the

study was repeated in Δapg12 cells, with impeded autophagocytosis, a general decrease in cytoplasmic staining was observed, whereas the YR structures were clearly visible in all the cells. Interestingly, incubation of these cells for 2 h in SD(-N) medium did not result in the loss of the YR structures as observed before in wild-type and Δyol082 cells. The effect of the inactivation of the autophagy pathway on the distribution of GFP-Yol082p led us to study the distribution of the Yol082 Δ C32p-GFP mutant protein that, as described above, was unable to complement the defect in the vacuolar targeting and processing of pAPI. The expression of Yol082 Δ C32p-GFP in wild-type cells provoked a dramatic shift in the distribution of the protein, as shown both by the disappearance of the cytoplasmic staining and the increase in size of many YR structures. Again, as observed in Δapg12 cells the incubation of these cells in SD(-N) medium did not change the pattern of Yol082 Δ C32p-GFP distribution.

Analysis of the localization of the YR structures at different time intervals by time-lapse confocal microscopy (Fig. 10) showed that they were highly mobile, as shown both by their lateral displacement and their continuous popping on and off from the plane under focus. On average a 0.27- μm YR structure was found to move at a rate of 1 nm/s.

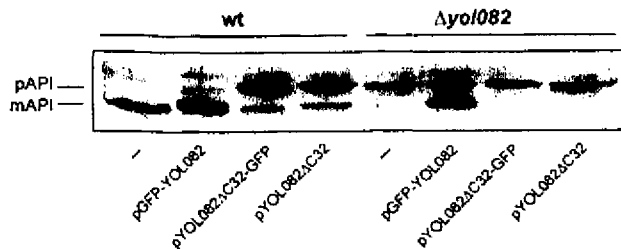
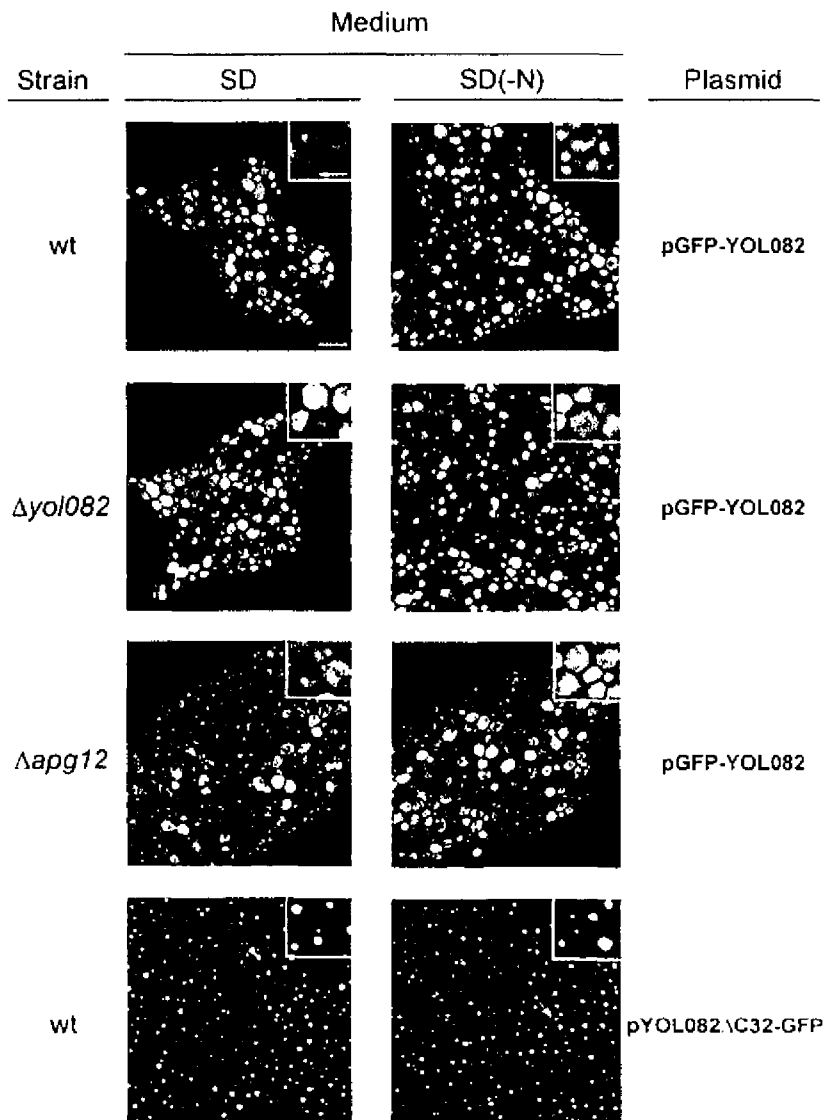


FIG. 8. GFP-Yol082p, but not Yol082 Δ C32p-GFP or Yol082 Δ C32p, complements the defect in the vacuolar import and processing of pAPI produced by disruption of YOL082. Cells of the wild-type and the mutant Δyol082 strains, transformed with either pGFP-YOL082, pYOL082 Δ C32-GFP, or pYOL082 Δ C32, were grown to logarithmic phase in SD medium and blots from their crude extracts probed with the anti-API antibody.

FIG. 9. Cellular distribution of Yol082p. Changes in distribution of Yol082p between the cytoplasmic pool and YR structures produced by growing conditions and the inhibition of the transport activity are shown. Wild-type, Δapg12 , and Δyol082 strains transformed with pGFP-YOL082 or truncated pYOL082 Δ C32-GFP were grown in SD medium to 1.2 OD₆₀₀ and aliquots further incubated for 2 h in SD(-N) medium, as indicated in the panels. The cellular distributions of both fusion proteins were studied by fluorescence microscopy on air-dried cell smears. Insets are 2.7-fold magnification of the areas next to the white arrows. Bars: 6.64 and 2.3 μm .



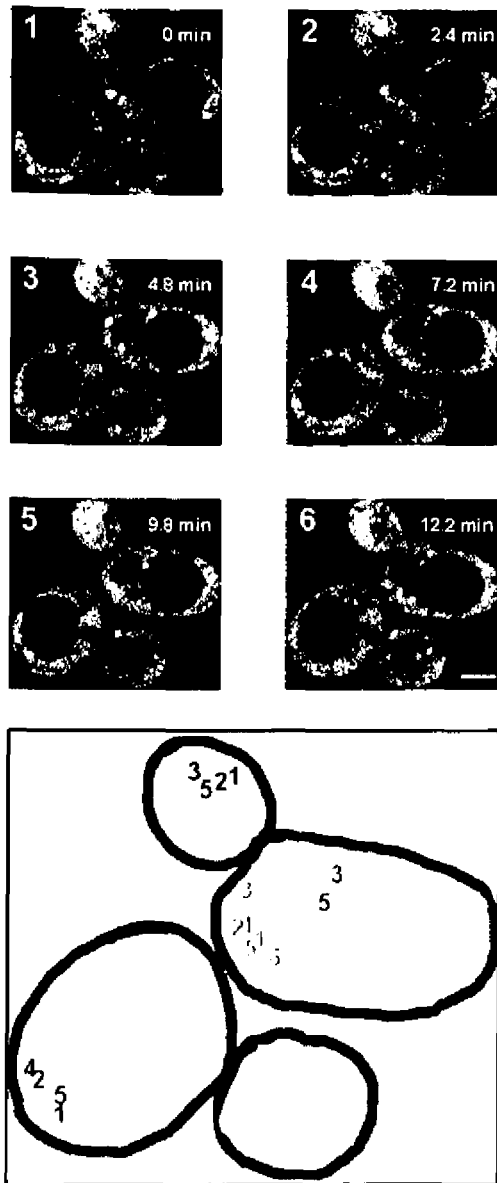


FIG. 10. YR structures are mobile. *Δyol082* cells transformed with pGFP-YOL082 were grown in SD medium to 1.2 OD₆₀₀ and the localization of the YR structures studied by confocal microscopy on air-dried cell smears. The 0.4- μ m plane cutting through the cells at 0.8 μ m from the plane of their attachment to the glass slide was photographed at intervals of 2.4 min (panels 1–6). The colored digits in the cell sketch at the bottom panel mark the positions of individual YR structures at time intervals of 2.4 min. Bar, 0.91 μ m.

DISCUSSION

In this study we have shown that Yol082p, identified in a whole-genome analysis of protein-protein interactions as an API-interacting protein (10), is required for vacuolar targeting and conversion of pAPI into mAPI, both in vegetative growth and under short term nitrogen starvation conditions.

The interaction of Yol082p with pAPI and mAPI, but not with the prepro-amino extension of the precursor, is particularly interesting given the role of the latter in the transport of pAPI to the vacuole and the observation that it is necessary and sufficient for the transport of the reporter protein GFP from the cytoplasm to the vacuole (9). This observation suggests that transport of API to the vacuole requires additional transport

determinants localized in the mature part, outside its amino extension. In addition, the stronger two-hybrid interaction of Yol082p with pAPI, as compared with mAPI, suggests that either Yol082p interacts physically with the amino extension in the context of the native protein or, alternatively, that the extension is required for proper folding and exposure of the transport determinants contained in the mature part of API to Yol082p. Clearly, further research is required to determine whether the determinants involved in its interaction with Yol082p are specific of API.

Our studies on the processing of pAPI in wild-type and *Δyol082* cells show that Yol082p is required for targeting and conversion of pAPI into mAPI in the vacuole, both under vegetative growth and short periods of nitrogen starvation. The rescue of the API processing defect in *Δyol082* cells transformed with Yol082p expressed from an inducible promoter unambiguously shows the involvement of Yol082p in the vacuolar import of pAPI.

The block in API vacuolar processing shown by *Δyol082* cells incubated for short periods in SD(-N) medium is in contrast to the ability of mutants with impeded API transport, such as *apg13*, *vac8*, *cvt3*, *aut2*, and *aut7*, to overcome the pAPI accumulation soon after their shift to medium without nitrogen (2, 24, 25). Furthermore, it is interesting that the inhibition of the pAPI processing in *Δyol082* cells is partially reversed by the extension of the nitrogen starvation period. Under these conditions, mAPI is detected after 12 h in SD(-N) medium, and maturation proceeds slowly to reach a plateau at ~30% in 16 h. These observations strongly suggest that Yol082p is involved in the rapid and specific capture of pAPI by the autophagosomes developed after a short starvation period, but not in the slow and unspecific capture that occurs with the engulfment of large portions of the cytoplasm after prolonged starvation.

App mutants (26) often show a correlation between the effect of the mutation in autophagosome biogenesis and the loss in viability under nitrogen starvation, so that mutants with defective autophagosome nucleation die earlier upon nitrogen deprivation (25). In this context it is, therefore, interesting that although Yol082p appears to function in an early step in the pathway of API transport, the *Δyol082* mutant is completely starvation-resistant. This resistance to starvation suggests again that Yol082p is not essential for autophagosome biogenesis.

Regarding the API transport step in which Yol082p is involved, we have shown that pAPI assembly into dodecamers takes place normally in the mutant cells. We also show that in the absence of Yol082p, the interaction of the oligomerized pAPI with the sequestering double-membrane sacs appears to be affected. The proteinase K protection assay performed with metabolically labeled protein reveals that, in the mutant strain, the newly synthesized pAPI remains unprotected in the cytoplasm after 2 h of its synthesis, which is in contrast to the wild-type. This difference suggests that Yol082p may work in the recognition of pAPI by the wrapping membranes or, alternatively, by closing these into vesicles. The recovery of the protease-sensitive pAPI extracted from *apg5*, *apg7*, *apg9*, *aut7/apg8*, and *cvt3* cells defective in biogenesis of the API transport vesicles (19, 27–29) with the membranes that float on Ficoll, and the exclusion of the bulk of the pAPI extracted from *Δyol082* cells from the membrane fraction, rather supports the first of the two above alternatives.

Confocal fluorescence microscopy studies, performed using the fluorescent protein GFP-Yol082p, show the existence of a pool of protein homogeneously distributed throughout the cytoplasm in equilibrium with a second pool organized into one or more round-shaped structures, which we have called YR. Fur-

thermore, the equilibrium is dramatically shifted by changes in the cell growing conditions, the ability of the cells to use the autophagy pathway, and the functional activity of GFP-Yol082p. Although we lack direct evidence on the meaning of the above changes in distribution, some of these observations suggest that the pool organized into YR structures could be actively engaged in the transport of pAPI to the vacuole by the Cvt pathway. With regard to this, the disappearance of the YR structures from cells incubated for 2 h in SD(-N) medium strongly suggests that they are not needed under conditions in which the autophagy pathway is activated. The difference between the rapid processing of pAPI in mutants with a defective Cvt pathway and the inability of $\Delta yol082$ cells to process pAPI, when they were incubated in SD(-N) medium, strongly suggests that transport of pAPI by the autophagy pathway requires the disassembly of the YR structures. This may be related to the decrease in the cytoplasmic pool of GFP-Yol082p and the enhanced visibility of YR structures observed in $\Delta apg12$ cells incubated with SD or SD(-N) medium, changes that could reflect a blockage of the Cvt/Apg pathways after the transport step mediated by Yol082p. Also interesting is the disappearance of the cytoplasmic protein and the increase in size of YR structures observed in wild-type cells expressing the functionally inactive Yol082 Δ C32p-GFP. This shift in equilibrium could again be consistent with our view that YR structures are involved in protein transport through the Cvt pathway, since the functionally inactive protein may cause the jam of the transport machinery and/or the accumulation of the transported material. A second alternative is the possibility that the deletion of the last 32 residues may shift the protein equilibrium toward the YR structures, which could also explain the insensitivity of these to the incubation of cells in SD(-N) medium. Obviously, these two possibilities are not mutually exclusive.

Because of its behavior as a Cvt protein we propose to rename Yol082p as Cvt19p.

Further research is required to characterize the transport step mediated by Yol082p, a step that appears to lay after the assembly of pAPI into dodecamers and before the wrapping of Cvt complexes by the saccular structures.

Acknowledgments—We thank Dr. G. Högenauer for kindly supplying the anti-CPY antibody, Eulalia Morgado for construction of the plasmids containing wild-type and truncated forms of *YOL082* and measurement of β -galactosidase, and O. Zaragoza for helpful discussions. We also thank Carlos Sánchez, from the Servicio de Microscopía Óptica y

Confocal, Centro de Biología Molecular Severo Ochoa, for his help with the confocal images.

REFERENCES

- Klionsky, D. J., Cueva, R., and Yaver, D. S. (1992) *J. Cell Biol.* **119**, 287–299
- Baba, M., Osumi, M., Scott, S. V., Klionsky, D. J., and Ohsumi, Y. (1997) *J. Cell Biol.* **139**, 1687–1695
- Scott, S. V., Hefner-Gravink, A., Morano, K. A., Noda, T., Ohsumi, Y., and Klionsky, D. J. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **93**, 12304–12308
- Scott, S. V., Baba, M., Ohsumi, Y., and Klionsky, D. J. (1997) *J. Cell Biol.* **138**, 37–44
- Seguí-Real, B., Martínez, M., and Sandoval, I. V. (1995) *EMBO J.* **14**, 5476–5484
- Oda, M. N., Scott, S. V., Hefner-Gravink, A., Caffarelli, A. D., and Klionsky, D. J. (1996) *J. Cell Biol.* **132**, 999–1010
- Silles, E., Mazón, M. J., Gevaert, K., Goethals, M., Vandekerckhove, J., Leber, R., and Sandoval, I. V. (2000) *J. Biol. Chem.* **275**, 34054–34059
- Satyanarayana, C., Schroder-Kohne, S., Craig, E. A., Schu, P. V., and Horst, M. (2000) *FEBS Lett.* **470**, 232–238
- Martínez, E., Seguí-Real, B., Silles, E., Mazón, M. J., and Sandoval, I. V. (1999) *Mol. Microbiol.* **33**, 62–62
- Uetz, P., Giot, L., Cagney, G., Mansfield, T. A., Judson, R. S., Knight, J. R., Lockahon, D., Narayan, V., Srinivasan, M., Pochart, P., Qureshi-Emili, A., Li, Y., Godwin, B., Conover, D., Kalbfleisch, T., Vijayadmodar, G., Yang, M., Johnston, M., Fields, S., and Rothberg, J. M. (2000) *Nature* **403**, 623–627
- Baudin, A., Ozier-Kalogeropoulos, O., Denouel, A., Lacroute, F., and Cullin, C. (1993) *Nucleic Acids Res.* **21**, 3329–3330
- Wach, A., Brachat, A., Pohlmann, R., and Philippsen, P. (1994) *Yeast* **10**, 1793–1808
- Niedenthal, R. K., Riles, L., Johnston, M., and Hegemann, J. H. (1996) *Yeast* **12**, 773–786
- Ito, H., Fukuda, Y., and Kimura, A. (1983) *J. Bacteriol.* **163**, 163–168
- James, P., Hailaday, J., and Craig, E. A. (1996) *Genetics* **144**, 1425–1436
- Adams, A., Gottschling, D. E., Kaiser, C. A., and Stearns, T. (1997) *Methods in Yeast Genetics*, pp. 123–127. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY
- Kim, J., Scott, S. V., Oda, M. N., and Klionsky, D. J. (1997) *J. Cell Biol.* **137**, 609–618
- Scott, S. V., and Klionsky, D. J. (1995) *J. Cell Biol.* **131**, 1727–1735
- Noda, T., Kim, J., Huang, W. P., Baba, M., Tokunaga, C., Ohsumi, Y., and Klionsky, D. J. (2000) *J. Cell Biol.* **148**, 465–480
- Winzler, E. A., Shoemaker, D. D., Astromoff, A., Liang, H., Anderson, K., Andre, B., Bangham, R., Benito, R., Boeke, J. D., Bussey, H., Chu, A. M., Connolly, C., Davis, K., Dietrich, F., Dow, S. W., El, B. M., Foury, F., Friend, S. H., Gentalan, E., Giaever, G., Hegemann, J. H., Jones, T., Laub, M., Liao, H., Davis, R. W., et al. (1999) *Science* **285**, 901–906
- Kim, J., and Klionsky, D. J. (2000) *Annu. Rev. Biochem.* **69**, 303–342
- Harding, T. M., Hefner-Gravink, A., Thumm, M., and Klionsky, D. J. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**, 17621–17624
- Mizushima, N., Noda, T., Yoshimori, T., Tanaka, Y., Ishii, T., George, M. D., Klionsky, D. J., Ohsumi, M., and Ohsumi, Y. (1998) *Nature* **395**, 395–398
- Scott, S. V., Nice, D. C., Nau, J. J., Weisman, L. S., Kamada, Y., Keizer-Gunnink, I., Funakoshi, T., Veenhuis, M., Ohsumi, Y., and Klionsky, D. J. (2000) *J. Biol. Chem.* **275**, 25840–25849
- Abeliovich, H., Dunn, W. A. J., Kim, J., and Klionsky, D. J. (2000) *J. Cell Biol.* **151**, 1025–1034
- Tsukada, M., and Ohsumi, Y. (1993) *FEBS Lett.* **333**, 169–174
- George, M. D., Baba, M., Scott, S. V., Mizushima, N., Garrison, B. S., Ohsumi, Y., and Klionsky, D. J. (2000) *Mol. Biol. Cell* **11**, 969–982
- Kim, J., Dalton, V. M., Eggerton, K. P., Scott, S. V., and Klionsky, D. J. (1999) *Mol. Biol. Cell* **10**, 1337–1351
- Huang, W. P., Scott, S. V., Kim, J., and Klionsky, D. J. (2000) *J. Biol. Chem.* **275**, 5845–5851

The prepropeptide of vacuolar aminopeptidase I is necessary and sufficient to target the fluorescent reporter protein GFP to the vacuole of yeast by the Cvt pathway

Eduardo Martínez,^{1†} Bartolomé Seguí-Real,¹ Eduardo Siles,² María J. Mazón² and Ignacio V. Sandoval^{1*}

¹Centro de Biología Molecular Severo Ochoa, and

²Instituto de Investigaciones Biomédicas Alberto Sols, CSIC, Facultad de Ciencias, Universidad Autónoma de Madrid, Cantoblanco, Madrid 28049, Spain.

Summary

We have studied the capacity of the prepro amino extension of vacuolar protease leucine aminopeptidase I (API) to target the fluorescent reporter protein GFP to the vacuole of yeast. The preproGFP chimera constructed by extending the amino end of GFP with the prepro-part of API is rapidly degraded in both wild-type WCG cells and WCG 11/21a cells deficient in the proteasome. In contrast, the chimera expressed in WCG-PP cells deficient in both proteasome activity and vacuolar proteinase A accumulates in the vacuole, where it remains stable. Replacement of Gly by Ile-7, a substitution that prevents folding of the pre-part into an amphipathic helix and inhibits the targeting of the API precursor to the vacuole, inhibits the targeting of preproGFP to the vacuole. The separated pre- and pro-parts of the API precursor do not target GFP to the vacuole. Targeting of preproGFP to the vacuole is independent of its levels of expression, as the fluorescent protein localizes to the vacuole in cells expressing the protein under the control of both the GAL 1/10 or the API promoter. The preproGFP expressed under both promoters is recovered as monomers from cytosolic cell extracts. PreproGFP expressed under the API promoter is packed into cytoplasmic bodies that penetrate into the vacuolar lumen to release the protein. Altogether our results show that the prepro-part of the API precursor is necessary and sufficient to target the green fluorescent reporter protein to the vacuole.

Received 15 September, 1998; revised 24 March, 1999; accepted 14 April, 1999. †Present address: Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, Havana, Cuba. *For correspondence. E-mail: isandoval@cblm.uam.es; Tel. (+91) 397 8455; Fax (+91) 397 4799.

Introduction

The vacuolar protein API (Klionsky *et al.*, 1992) appears to be transported to the vacuole by a route different from the secretory pathway that overlaps with autophagy (Harding *et al.*, 1996; Schlumpberger *et al.*, 1997; for reviews, see Stack and Emr, 1993; Chapman, 1994; Klionsky, 1998). The protein has no predictable endoplasmic reticulum (ER) signal peptide, its transport is not inhibited by a block of the secretory pathway and, upon overexpression, instead of being secreted, it accumulates in the cytoplasm (Klionsky *et al.*, 1992).

The API precursor has a 45-amino-acid amino extension (Distel *et al.*, 1983; Chang and Smith, 1989; Klionsky *et al.*, 1992) which, upon transport of the protein to the vacuole, is proteolytically cleaved in two steps: first, the 16 amino-terminal residues that constitute the prepart are excised by a mechanism involving proteinase A (PrA); and then the 29-amino-acid long propart is cut in a proteinase B (PrB)-dependent fashion (Seguí-Real *et al.*, 1995). Whereas point mutations within the prepart (Oda *et al.*, 1996; Martínez *et al.*, 1997) result in retention of the protein in the cytoplasm, only extensive deletions of the propart are inhibitory of transport (Oda *et al.*, 1996).

Definitive proof of the role of a protein domain in transport rests on its ability to provoke the same transport phenomena in a reporter protein. The failure to target chimeras bearing the prepro-part of API to the vacuole has led to the suggestion that other domains may also be required for its vacuolar import (Oda *et al.*, 1996). Moreover, the disclosure that API homododecamers are wrapped in the cytoplasm by double-membrane sac structures before their transport to the vacuole (Kim *et al.*, 1997; Scott *et al.*, 1997) may also suggest that the role of the prepro-part is to guarantee the correct folding required to target the protein to the vacuole.

We report here that the prepro-part of the API precursor is necessary and sufficient to target the reporter protein GFP to the vacuole by a mechanism dependent on the folding of the prepart into an amphipathic α -helix. Unlike API, preproGFP is recovered as monomers from cytosol extracts and, as API preproGFP, is packed into cytoplasmic vesicles that are unloaded into the vacuolar lumen.

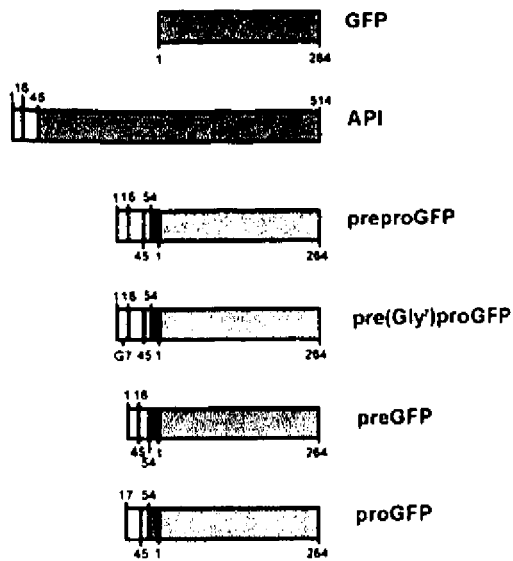


Fig. 1. GFP chimeras constructed with the wild and mutated prepro amino extension of API. Grey bars, full-length GFP and mature API. Numerals indicate the residue numbers in the proteins of origin. 1–16 block, API prepart; 17–45 block, API prepart; 46–54 block, nine-residue stretch of the API sequence immediately carboxyl to the prepart; dark grey block, 18-residue-long pGFP-N2 DNA sequence extending between nucleotides 631 (*EcoRI* cloning site) and 682 (nucleotide immediately before the ATG initiation codon of GFP); the preproGFP carried under the API promoter in the pGFP-C-FUS plasmid had a nine-residue spacer between the amino extension of API and the ATG initiation codon of GFP. The pre(Gly-7)proGFP mutant was developed by substituting Gly for Ile-7 in the API prepart.

Results

To study whether the prepro-part of the API precursor was able to target the green fluorescent protein (GFP) to the vacuole, the constructs depicted in Fig. 1 were developed.

Accumulation of fluorescent GFP in wild-type yeast cells is enhanced by inactivation of the proteasome system of protein degradation

Wild-type WCG cells (Table 1), with fully active systems of protein degradation in the cytoplasm (*yscE*⁺) and vacuole (*yscA*⁺), transformed with pEMBLyex4-GFP, a plasmid that carries GFP under the control of the GAL1/10 promoter, showed no detectable levels of GFP after a 4 h induction with galactose, as shown by both Western blot and fluorescence microscopy studies (data not shown). In contrast, induction of GFP in WCG 11/21a cells (Table 1) (Heinemeyer *et al.*, 1993), a strain defective in the 22.6 and 31.6 subunits of *yscE* (Achstetter *et al.*, 1984), the yeast equivalent of the amphibian and mammalian proteasome (Kleinschmidt *et al.*, 1988; Heinemeyer *et al.*, 1991), resulted in cellular accumulation of low but significant amounts of GFP after a 4 h induction with galactose, as shown by Western blot analysis of cell extracts (Fig. 2A, lane 1).

Extension of GFP with the amino-terminal prepro-part of vacuolar API results in rapid degradation of the chimera

Western analysis of WCG 11/21a cells transformed with the pEMBLyex4 plasmid carrying preproGFP, a chimera constructed by extending the amino-end of GFP with the prepro-part of the API precursor (Fig. 1), and induced for 4 h with galactose revealed a major protein species with the size expected for preproGFP, 38 kDa, as well as a minor 40 kDa species, probably a transport intermediate produced by post-translational modification of preproGFP (our unpublished results) (Fig. 2A, lane 2). Comparison of the levels of GFP and preproGFP in WCG 11/21a cells induced for 4 h with galactose showed that the levels of the chimera were much higher than the GFP levels (see

Table 1. Yeast strains.

Strain	Genotype
MB3	Mat α <i>ura3::LYS2 his3-Δ200 ade2 lys2 leu2-Δ1</i>
MB3 Δ^a	Mat α <i>ura3::LYS2 his3-Δ200 lap4::HIS3 ade2 lys2 leu2-Δ1</i>
BJ5458 ^b	Mat α <i>ura3-52 trp1 lys2-801 leu2-Δ1 his3Δ200 pep4::HIS3 prb1Δ1.6R can1 GAL</i>
BJ5458 Δ^a	Mat α <i>ura3-52 trp1 lys2-801 leu2-Δ1 lap4::LEU2 his3-Δ200 pep4::HIS3 prb1Δ1.6R can1 GAL</i>
JMR 151	MAT α <i>sec63 pep4-3 leu2-3,-112 ura3-52</i>
WCG-11/21a ^c	Mat α <i>pre1-1 pre2-2 his3-11,-15 leu2-3,-112 ura3 Can^o GAL</i>
WCG-PP	Mat α <i>pre1-1 pre2-2 his3-11,15 leu2-3,-112 ura3 pep4ΔEN::HIS3 Can^o GAL</i>
WCG-PP	Mat α <i>pre1-1 pre2-2 his3-11,15 leu2-3,-112 ura3 pep4ΔEN::HIS3 Can^o GAL</i>
WCG-PP Δ	Mat α <i>pre1-1 pre2-2 his3-11,15 leu2-3,-112 ura3 lap4::LEU2 pep4ΔEN::HIS3 Can^o GAL</i>

a. Seguí-Real *et al.* (1995).

b. Jones (1991).

c. Heinemeyer *et al.* (1993).

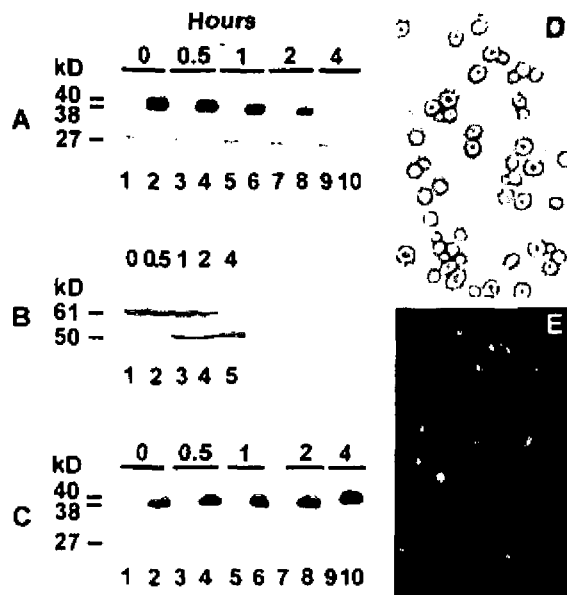


Fig. 2. Extension of GFP with the prepro-part of API results in rapid degradation of the reporter protein. **A.** Analysis of extracts from WCG 11/21a cells transformed with either plasmid pEMBLyex4-GFP (odd-numbered lanes) or plasmid pEMBLyex4-preproGFP (even-numbered lanes) by Western blot using an antibody specific for GFP. The proteins were induced for 4 h with 2% galactose and then repressed with 2% glucose for the indicated times. Note the stability of the 27 kDa GFP and the rapid degradation of the 38 kDa and 40 kDa preproGFP species. **B.** MB3D cells transformed with plasmid pEMBLyex4-preproAPI. API was induced for 4 h with 2% galactose, then repressed with 2% glucose for the indicated times. The API species were analysed by Western blot using an antibody specific for API. Observe the progressive conversion of the 61 kDa preproAPI into the 50 kDa mature API species. **C.** The same experiment as in (A), but the cells were treated with 1 mM PMSF at the beginning of the protein induction. Note the stabilization of the 38 kDa and 40 kDa preproGFP by the PMSF addition. **D** and **E.** Cellular distribution of preproGFP in WCG 11/21a cells. The chimera was induced with 2% galactose for 4 h as described above and photographed through Nomarsky optics (**D**) and fluorescence (**E**). Note the exclusion of fluorescent GFP from the vacuoles and its accumulation in the cytoplasm.

Fig. 2A, lane 1). Although the cause of the difference was not investigated, it may result from differences in the rates of RNA transcription or RNA stability. Interestingly, the stabilities of GFP and preproGFP after repression of their expression with glucose were different: whereas the trace amounts of GFP were highly stable (Fig. 2A, odd-numbered lanes; Fig. 3A), the accumulated preproGFP decreased rapidly with time (Fig. 2A, even-numbered lanes; Fig. 3A). Moreover, the decrease in the preproGFP levels was prevented by treating the cells at the beginning of the preproGFP induction with phenylmethylsulphonyl fluoride (PMSF), a strong inhibitor of serine proteases and, in particular, of vacuolar proteinase B (Fig. 2C, even-numbered

lanes; Fig. 3A), suggesting that GFP was degraded in the vacuole. This was also suggested by the observation that the rate of preproGFP degradation and the rate of conversion of the API precursor into mature API in the vacuole were similar (compare Fig. 2A, even-numbered lanes; Fig. 2B).

To study the distribution of preproGFP in WCG 11/21a cells, the cells were studied by microscopy through both fluorescence and Nomarsky optics. The study showed the fluorescent protein in the cytoplasm but not in the vacuole (see Fig. 2D and E).

Altogether, these results suggested that preproGFP was being degraded in the vacuole and, by extension, that the prepro-part of GFP was able to target GFP to the vacuole.

WCG-PP cells deficient in the proteasome and proteinase A systems of proteolytic degradation express stable levels of preproGFP

To study whether preproGFP was targeted to the vacuole further, we sought evidence that the protein was degraded in the vacuole. For this purpose, we investigated the stability and distribution of preproGFP in cells deficient in proteinase A. WCG-PP cells deficient in proteinase A were developed by disrupting the *pep4* gene in WCG 11/21a cells (Table 1). Cells carrying the *PEP4::HIS3* allele are deficient in vacuolar proteinase A (Ammerer *et al.*, 1986; Woolford *et al.*, 1986) and, as a result, are unable both to activate the cascade of *yscA* proteases involved in vacuolar protein processing and degradation (Hemmings *et al.*, 1981; Jones, 1984; Ammerer *et al.*, 1986), and to excise and convert the API precursor into the mature species (compare Fig. 4A and B) (Trumbly and Bradley, 1983; Klionsky *et al.*, 1992; Segui-Real *et al.*, 1995).

Comparison of the rates of preproGFP degradation between WCG 11/21a (Figs 3B and 4C, lanes 2–6) and WCG-PP cells (Figs 3B and 4C, lanes 7–11) after 4 h of induction and the repression of its expression for time periods between 30 min and 4 h revealed that, whereas the chimera was degraded rapidly in WCG 11/21a cells, its levels remained stable in WCG-PP cells. Moreover, the detection of GFP traces in WCG 11/21a extracts (Fig. 4C, compare lane 1 with lanes 2–6) indicated some conversion of preproGFP into GFP. Altogether, these results suggested strongly that preproGFP was processed and degraded in the vacuole.

PreproGFP accumulates in the vacuoles of WCG-PP cells

To prove that preproGFP was transported to the vacuole, we studied its distribution in WCG-PP cells after a 4 h induction with 2% galactose. We observed that, in most of the cells, the induced preproGFP was displayed in

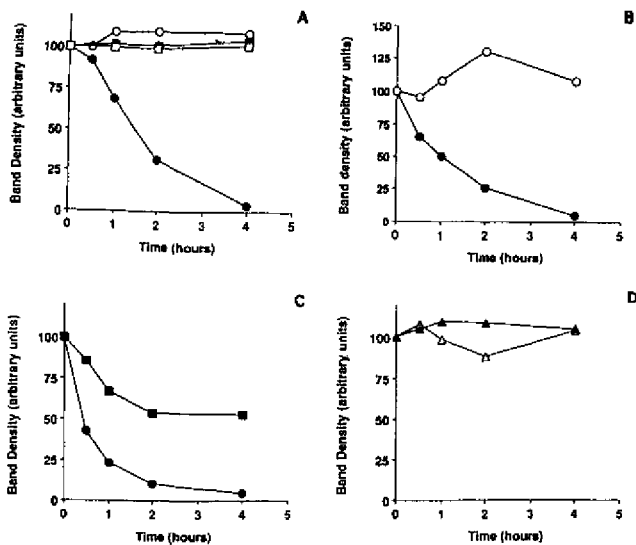


Fig. 3. Rates of degradation of GFP and GFP chimeras in WCG 11/21a cells and WCG-PP cells. Wild-type GFP and GFP chimeras were induced for 4 h in 2% galactose, and their synthesis was repressed with 2% glucose for the indicated times. Protein levels were quantified by scanning densitometry of Western blots performed with the anti-GFP specific antibody and developed using the ECL technique. A. Rates of GFP (■, □) and preproGFP (●, ○) degradation in WCG 11/21a cells treated at the beginning of the protein induction without (●, ■) or with (○, □) 1 mM PMSF. B. Rates of preproGFP degradation in WCG 11/21a cells (●) and WCG-PP cells (○). C. Rates of preproGFP (●) and pre(Gly-7)proGFP (■) degradation in WCG 11/21a cells. D. Resistance of preGFP (▲) and proGFP (△) to degradation by WCG 11/21a cells.

large round vacuoles, which stood out brightly from the dim fluorescent cytoplasm (Fig. 5), a distribution that was in contrast to its distribution in WCG-11/21 cells (compare Figs 5 and 2E). The same result was observed in a study performed with WCG-PPΔ cells deficient in API (Table 1; data not shown), thus indicating that the targeting of preproGFP to the vacuole does not require the targeting determinants contained in the API molecule. In addition, we observed that JMR 151 cells (Table 1), a temperature-sensitive sec 63 complex mutant, which is unable to translocate proteins with signal sequences of relatively low hydrophobicity to the ER lumen at the restrictive temperature (Feldheim and Sheckman, 1994; Ng *et al.*, 1996), accumulates preproGFP in the vacuole at the restrictive temperature (data not shown). This observation discarded the theory that preproGFP was transported to the vacuole through the secretory pathway.

The transport-competent preproGFP and API precursor are recovered with the vacuole-rich fraction, which excludes the transport-incompetent preAPI and proAPI

To assess further the ability of the prepro-part to target GFP to the vacuole, we studied the partition of preproGFP between a cell vacuole-rich and a vacuole-free fraction. For this purpose, MB3D cells transformed with the pEM-Blyex4 plasmid carrying the API (A), preAPI (Fig. 6B) or proAPI genes (Fig. 6C) and WCG 11/21 cells transformed with the same plasmid carrying the preproGFP gene (Fig. 6D) were induced for 4 h with 2% galactose and rapidly fractionated by differential centrifugation into vacuole-rich and vacuole-free fractions (Scott and Klionsky, 1995). The vacuole-rich fraction purified by this method has been

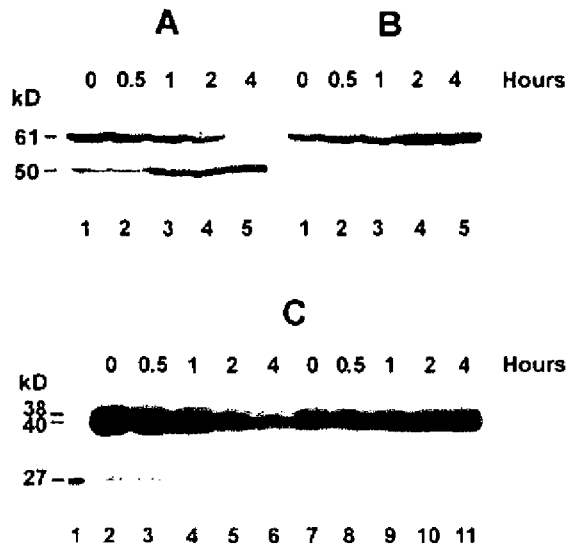


Fig. 4. Induced API precursor and preproGFP remain stable in proteinase A-deficient cells. A and B. Conversion of the API precursor into mature API is dependent on proteinase A activity. BJ5458 (A) and BJ5458Δ (B) cells were transformed with the pEMBLyex4-preproAPI plasmid. API was induced by incubation for 4 h with galactose and then repressed by incubation with 2% glucose for the indicated times. The API species were scrutinized by Western blot using an antibody specific for API. Observe the conversion of the 61 kDa API precursor into the 50 kDa API mature species in BJ5458 cells (A) and how the proteinase A deficiency prevented the conversion in BJ5458Δ cells (B). C. Conversion of preproGFP into GFP and their degradation in wild-type WCG11/21 cells and proteinase A-deficient WCG-PP cells. WCG 11/21a cells (lanes 2–6) and WCG-PP cells (lanes 7–11) were transformed with the pEMBLyex4-preproGFP plasmid, and preproGFP was induced, repressed and studied with the anti-GFP antibody as described in (A) and (B). Note the decrease in the levels of preproGFP and the generation of small amounts of GFP in WCG 11/21a cells (compare lanes 2–6 with lane 1, loaded with GFP) and its stability and lack of GFP production in WCG-PP cells.

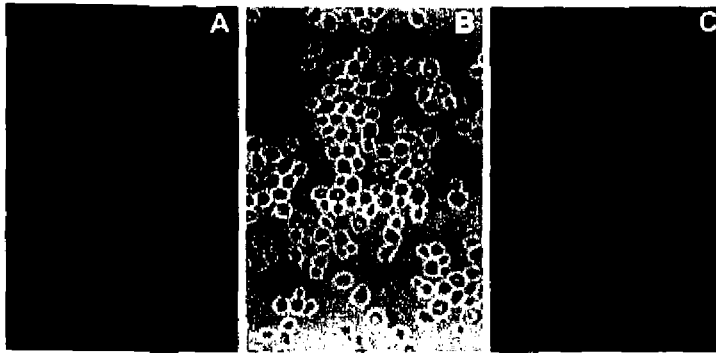


Fig. 5. PreproGFP accumulates in the vacuoles of WCG-PP cells deficient in proteinase A. PreproGFP was induced for 4 h by incubating WCG-PP cells transformed with the pEMBLyex4-preproGFP plasmid with 2% galactose. The cellular distribution of preproGFP was studied by microscopy and photographed through fluorescence (A) and Nomarsky optics (B), and the images superimposed (C).

shown to contain most of the membrane-bound transport-competent API precursor as well as mature API (see Fig. 6A). The contrast between the recovery of mature API and the API precursor with the vacuole-rich fraction and the exclusion of the transport-incompetent preAPI (Fig. 6B) and proAPI from this fraction (Fig. 6C) led us to study the partition of preproGFP and GFP in WCG11/21 cells transformed with the chimera. We observed that, after 4 h of induction, most of the preproGFP and its GFP product were recovered with the vacuole-rich fraction (Fig. 6D). This result suggested strongly that preproGFP was targeted and converted into GFP in the vacuole.

Substitution of Gly for Ile-7 prevents folding of the prepart into an amphipathic helix and blocks the transport of preproGFP to the vacuole

To investigate further the role of the prepart in the targeting of preproGFP to the vacuole, we disrupted its folding into the amphipathic α -helix required for its transport into the vacuole (Oda *et al.*, 1996; Martínez *et al.*, 1997). For this purpose, Gly was substituted for Ile-7 (Martínez *et al.*, 1997), and the degradation rates of the pre(Gly-7)proGFP mutant (Figs 7B and 3C) and preproGFP (Figs 7A and 3C) were compared after their induction for 4 h with 2% galactose and different periods of repression with glucose. It was observed that the Gly-7 mutation inhibited the preproGFP degradation strongly. Furthermore, the mutant was retained in the cytoplasm and excluded from the vacuole, as shown by microscopy studies (data not shown). Altogether, these results indicate that, as shown for API, the prepart of preproGFP must fold into an amphipathic α -helix to target GFP to the vacuole.

Targeting of GFP from the cytosol to the vacuole requires the action in tandem of the pre- and proparts of API

Whereas both the pre- and propart are required to target API to the vacuole, the observation that only large deletions

of the prepart inhibit its targeting to the vacuole has led to the proposal that it may function as a passive spacer between the pre- and mature parts of API and/or influence its folding (Oda *et al.*, 1996). To study this, we investigated whether the pre- and proparts were able to sustain the transport of GFP to the vacuole by themselves. It should be noted that the preproGFP, preGFP and proGFP constructs displayed a stretch of 27 residues between their amino extensions and the first GFP residue, capable of

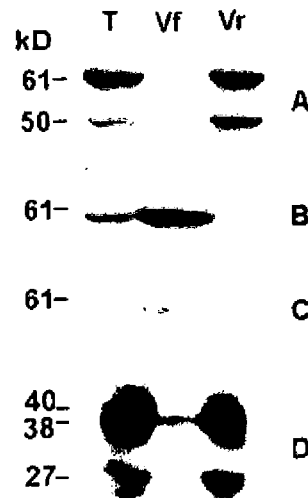


Fig. 6. Cell fractionation pattern of API, preAPI, proAPI, preproGFP and related products. MB3D cells (A–C) and WCG 11/21 cells (D) were transformed with the pEMBLyex4-plasmid carrying the API, (A) preAPI, (B) proAPI and (C) preproGFP genes under the control of the GAL1/10 promoter. The proteins were induced by incubation with 2% galactose for 4 h and their distribution studied in whole extracts (T), vacuole-free (Vf) and vacuole-rich (Vr) fractions (Scott and Klionsky, 1995) by Western blot using specific antibodies against API and GFP. Note the recovery of most of the transport-competent API precursor (A) and preproGFP protein (D) with the vacuole-rich fraction and the detection of mature API and GFP in this fraction, and the recovery of the transport-incompetent preAPI (B) and proAPI proteins (C) with the vacuole-free fraction.

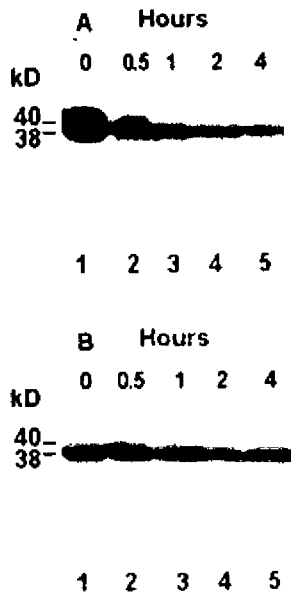


Fig. 7. Prevention of the folding of the prepart into an amphipathic α -helix slows down the degradation of preproGFP in WCG 11/21a cells. WCG 11/21a cells transformed with the pEMBLyex4-preproGFP (A) and pEMBLyex4-pre(Gly⁷)proGFP (B) plasmids were induced by incubation for 4 h with 2% galactose and then repressed with 2% glucose for the indicated times. The proteins in the cell extracts were studied by Western blot using the antibody against GFP. Note the contrast between the decrease in preproGFP levels and the stability of pre(Gly-7)proGFP through the repression with glucose.

acting as a spacer between the two. The study included comparison of the rates of preGFP and proGFP degradation in WCG 11/21a cells and an examination of their distribution in WCG-PP cells. We observed that, in contrast to preproGFP (Figs 2A and 3A), the levels of preGFP (Fig. 8A and B) and proGFP (Fig. 8C) had not declined 4 h after the repression of their synthesis. Moreover, overexposed blots of WCG 11/21a extracts containing high levels of preGFP (Fig. 7A) did not show the traces of GFP detected in extracts of WCG 11/21a cells transformed with preproGFP (Fig. 8A, compare lanes 1 and 2). These observations and the exclusion of preGFP and proGFP from the vacuole of WCG-PP cells (Fig. 8E–G) indicate that neither the pre- nor the proparts can sustain the targeting of GFP to the vacuole by themselves. Moreover, the fact that preGFP with 27 residues interposed between the prepart and GFP is not targeted to the vacuole suggests that the propart plays an active role in the targeting of GFP to the vacuole.

Native preproGFP is recovered as monomers from WCG-PP cells expressing the protein under the control of the GAL1/10 or the API promoters

The observation that API assembles in the cytoplasm into large dodecamers that are transported intact to the vacuolar lumen (Kim *et al.*, 1997) made it interesting to study whether preproGFP was also assembled into a multimeric complex and if the assembly was required for its targeting to the vacuole. For this purpose, WCG-PP and WCG-PP Δ cells deficient in API were transformed with the plasmids

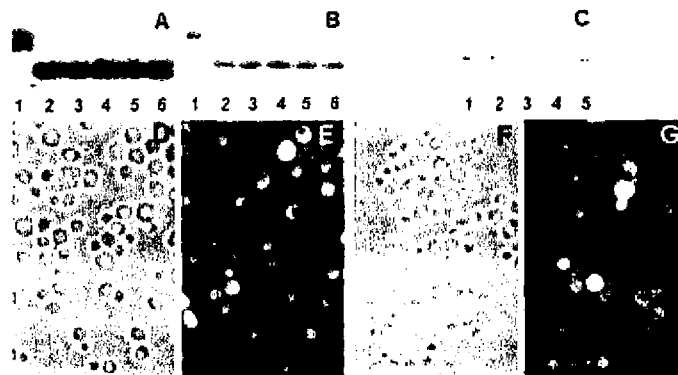


Fig. 8. PreGFP and proGFP are not targeted to the vacuole. WCG 11/21a cells were transformed with plasmids pEMBLyex4-preGFP and pEMBLyex4-proGFP. The proteins were induced by incubation for 4 h with 2% galactose, repressed with 2% glucose for the indicated times, and their levels in the cell extracts studied by Western blot using the antibody against GFP. A and B. Two different exposures of the same blot showing the levels of preproGFP (lane 1) and preGFP after 4 h induction with galactose (lane 2) and the levels of preGFP through the repression with glucose (lanes 3–6). C. The levels of proGFP through the chase with glucose. Note the stability of preGFP and proGFP as well as the absence of GFP from the cell extracts. The protein marked with an arrowhead in (A) migrated consistently more slowly than the GFP in lane 1. Cellular distributions of preGFP (D and E) and proGFP (F and G) in WCG-PP cells induced for 2 h and 12 h with 2% galactose respectively. The cellular distribution of the two proteins was studied by microscopy and photographed through Nomarsky optics (D and F) and fluorescence (E and G). Note the exclusion of both proteins from the vacuoles (arrows).



Fig. 9. Native preproGFP is recovered as a monomer from cells expressing the protein under the GAL1/10 or API promoters. Cytosol from WCG-PP cells transformed with the pEMBLyex4-preproGFP and induced for 4 h with galactose or transformed with the pGFP-C-FUS preproGFP plasmid carrying the protein under the control of the API promoter was fractionated by sedimentation velocity centrifugation using 20–50% glycerol 5 ml gradients (see *Experimental procedures*). Proteins in the 0.5 ml fractions were resolved by SDS-PAGE, blotted onto nitrocellulose and probed with a rabbit polyclonal antibody against the prepro-N-extension of API (see *Experimental procedures*). The top and bottom of the gradients are marked T and B respectively. ppAPI, 61 kDa preproAPI; ppAPI*, 63 kDa preproAPI species; ppGFP, 38 kDa preproGFP; ppGFP*, 40 kDa preproGFP species.

pEMBLyex4-preproGFP and pGFP-C-FUS preproGFP to express the protein under the GAL1/10 and API promoters respectively. The cells were grown to an OD_{660} of 1.2, incubated for 4 h with 2% galactose (cells transformed with the pEMBLyex4-preproGFP plasmid) or without the sugar (cells transformed with the pGFP-C-FUS preproGFP plasmid), and their cytosol was fractionated by sedimentation velocity centrifugation using 20–50% glycerol gradients as described previously in the study of native API (Kim *et al.*, 1997). The 0.5 ml gradient fractions were analysed for their content of API precursor and preproGFP by Western blot and immunodetection with the antibody raised against the prepro-part of API. We observed that the distributions of the proteins extracted from cells expressing preproGFP under the GAL1/10 (Fig. 9, panel 1) and the API promoters (Fig. 9, panel 2) were similar through the gradient: whereas the preproAPI dodecamers were recovered with the bottom fractions, preproGFP was exclusively recovered with the light top fractions, fractions from which monomeric GFP was also recovered (data not shown). It is noteworthy that both preproAPI and preproGFP were stained by the antibodies as two closely migrating bands, of which the fast migrating bands corresponded to the API precursor and to preproGFP, and the slow bands to transport intermediates of the API precursor and preproGFP that accumulate in cells transformed with some prepart mutants defective in transport (our unpublished results)

Transport of PreproGFP to the vacuole is mediated by vesicles that penetrate into the vacuolar lumen

The mechanisms of transport of API to the vacuole have been reported to be similar, but not identical, in growing and starved cells expressing the protein constitutively; differences in size between the autophagosomes and the sac structures that prevail under these conditions have been reported (Scott *et al.*, 1996). To study the pathway of preproGFP transport to the vacuole in more detail, WCG-PP cells deficient in proteinase A were transformed with the preproGFP-C-FUS plasmid. The expression of preproGFP under the control of the API promoter helped to keep its concentration in the cytoplasm below the level that interfered with its study by light microscopy. In addition, the deficiency in proteinase A permitted us to examine whether, as reported for API (Scott *et al.*, 1996; Scott *et al.*, 1997), preproGFP was transported by vesicles that accumulate in the vacuolar lumen of proteinase B-deficient cells. Cells grown to an OD_{660} of 1 were incubated for 30 min at 30°C with FM4-64, a specific stain for the vacuolar membrane, then for 1 h at 30°C without the stain, and the cellular distribution of GFP and FM4-64 was studied by fluorescence microscopy. The cellular distribution of GFP conformed to three distinct patterns: small punctate fluorescent structures localized to the cytoplasm, often not stained by FM4-64 (Fig. 10A–D); punctate structures localized to the vacuolar lumen, mostly stained by FM4-64 (Fig. 10E–I); uniformly stained vacuoles (Fig. 10J–O). Localization of GFP-positive vesicles to the vacuolar lumen was rare compared with their localization in the cytoplasm. The pattern of GFP distribution conformed to the API targeting to the vacuole mediated by vesicles: first, packing of the protein into transport vesicles; then, fusion of the vesicles with the vacuolar membrane; and, finally, penetration of the vesicles into the vacuolar lumen to unload their contents by a mechanism that appears to involve the digestion of the vesicles.

Discussion

Transplantation of transport motifs into reporter proteins and the study of their effect on the distributions of the resulting chimeras is the ultimate test in the process of their characterization. The accumulation of GFP in the vacuoles of WCG-PP cells and the conversion of preproGFP into GFP in WCG 11/21a cells indicate that the amino prepro extension targets GFP to the vacuole. This conclusion is also supported by the contrast between the stability of GFP and the rapid degradation of preproGFP in WCG 12/21a cells, as well as by the stability of the chimera in WCG-PP cells. These results demonstrate that the first 54 residues of the vacuolar proteinase API are necessary and sufficient to target the reporter GFP to the

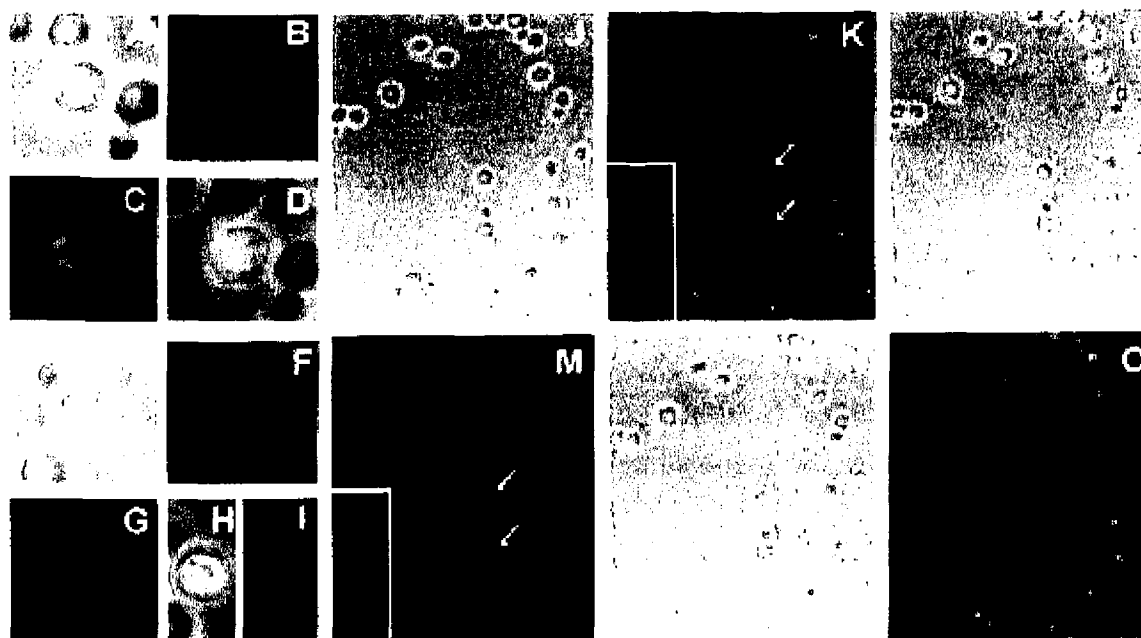


Fig. 10. Targeting of preproGFP to the vacuole of WCG-PP cells is mediated by vesicles. WCG-PP cells transformed with the pGFP-C-FUS preproGFP plasmid, carrying GFP under the control of the API promoter, were grown to an OD₆₆₀ of 1 and incubated for 30 min with the red vacuolar membrane marker FM4-64 ($1 \mu\text{g ml}^{-1}$) before further incubation without the stain at 30°C for 1 h. The cells were studied by light microscopy and photographed through Nomarsky optics (A, E, J, L and N) and fluorescent microscopy for FM4-64 (B, F and M), for GFP (C, G and K) and for both GFP and FM4064 (I and O). (D), (H), (L) and (N) were developed by superimposing (A) and (C), (E) and (F), (J) and (K), and (I) and (O) respectively. Note the accumulation of GFP in punctate structures not stained by FM4-64 (A–D) was localized to the cytoplasm or in punctate structures localized to the vacuolar lumen and stained by FM4-64 (E–I) and in the vacuolar lumen (J–O).

vacuole. To our knowledge, this is the first study showing that transplantation of a small domain from API is sufficient to target a reporter protein from the cytoplasm to the vacuole. A previous report from our laboratory showing that the reporter Cup1p was targeted to the vacuole when attached to the C-terminus of the API precursor did not investigate the domains of API involved in the targeting of the protein to the vacuole (Segui-Real *et al.*, 1995). The failure of previous attempts by us and others (Oda *et al.*, 1996) to produce transport-competent chimeras with specific domains of the API precursor remains unexplained. The nature of the reporter and/or the 27-residue spacer between the prepro-part and GFP might explain the new results. These results indicate that the prepro-part of the API precursor plays an active role in its transport to the vacuole and excludes the possibility that its role is merely to guarantee the correct folding of API for its subsequent wrapping and packing into transport vesicles.

The recovery of preproGFP molecules as monomers from cell extracts and the localization of GFP to vesicle-like structures within the cytoplasm and the vacuole of proteinase-deficient cells indicates that, unlike the API precursor, preproGFP is not assembled into dodecamers. Whereas this result discards the theory that proteins transported through the Cvt pathway must oligomerize as a

requisite for their capture by the vesicles that deliver them to the vacuole, it remains to be investigated whether preproGFP is integrated into the large globular cytoplasmic structures that host the API precursor as well as the mechanism by which it is loaded into the transport vesicles.

The inhibition of the targeting of preproGFP to the vacuole upon replacement of Gly for Ile-7 and after the excision of the pre- or pro parts excludes the possibility that its targeting may result from the unspecific engulfment of protein aggregates by autophagosomes and their subsequent fusion with the vacuole. The demonstration that folding of the prepart of API into an amphipathic α -helix is a must for its efficient targeting to the vacuole and the observation that the substitution of Gly for Ile-7 disrupts the helix and inhibits the transport of the API precursor (Oda *et al.*, 1996; Martinez *et al.*, 1997) and of preproGFP to the vacuole indicate that preproGFP and API are targeted to the vacuole by the same mechanism of transport. This result discards the hypothesis that mutations of the prepro-part that interfere with its normal folding (Oda *et al.*, 1996; Martinez *et al.*, 1997) may inhibit the transport of API to the vacuole by interfering with the global folding of the molecule.

With regard to the role of the pro part in the targeting of API to the vacuole, the lack of effect of point mutations on

the transport and its inhibition by large deletions has led to the suggestion that the pro-part might act as a passive spacer between the predomain and the protein (Oda *et al.*, 1996). The observation that preGFP with 27 residues between the prepart and GFP is not targeted to the vacuole suggests, however, that the pro-part may not play the role of a passive spacer as suggested.

Finally, we have observed that targeting to the vacuole of the preproGFP expressed under the control of the API promoter occurs by a pathway that shares many characteristics with the Cvt pathway involved in the transport of API to the vacuole: GFP is localized to vesicles within the cytoplasm and the vacuole, in addition to the vacuolar lumen. Future studies must determine the mechanism by which preproGFP is loaded into the transport vesicles.

Experimental procedures

Yeast strains

WCG 11/21a cells were made deficient in proteinase A by integration of plasmid PWO 120 carrying the pep4 Δ EN::HIS3 insert in the PRA locus. Both the plasmid used to disrupt PEP4 and the yeast strain were a gift from Dr D. H. Wolf. The genotypes of all the strains used in this study are shown in Table 1.

Culture media

Saccharomyces cerevisiae cells were transformed and selected on minimal media (YNB) supplemented with 2% dextrose as carbon source and the required amino acids according to the auxotrophic markers. Cells were grown in YNB supplemented with 2% dextrose or, when required, with 2% raffinose as a carbon source to facilitate the induction with galactose of the genes under the control of the inducible GAL1/10 promoter: the possibility that the short culture of the cells in raffinose and then in galactose may alter the pathway of API transport because of the comparatively slow growth of the cells under these conditions is discounted by the observation that targeting of API to the vacuole occurs by a similar mechanism in growing and starved cells (Baba *et al.*, 1997). Proteins were induced by the addition of 2% galactose. Growth was always performed at 30°C with continuous aerated shaking. *Escherichia coli* TG-1 were grown at 37°C in standard LB medium with or without 100 μ g ml⁻¹ ampicillin.

Antibodies

The polyclonal rabbit antibodies against the prepro-part and the whole API were developed in the laboratory. The antibody against the whole protein recognizes all the precursor, intermediate and mature forms of API (Segui-Real *et al.*, 1995). The rabbit polyclonal anti-GFP antibody was from Clontech Laboratories.

DNA manipulations and plasmid constructions

To transform and express preproGFP, preGFP and proGFP under the control of the GAL1/10 promoter, their DNAs were

manipulated as follows. The prepro-part of the API precursor was cloned into the plasmid pEMBLyex4, excised with *EcoRI*/*StuI*, cloned into the plasmid pGFP-N2 (Clontech) at the *EcoRI*/*SnaBI* site, restricted with *SacI*/*BclI* and cloned again into the *SacI*/*BamHI* site of pEMBLyex4. For the construction and *in vivo* expression of preGFP, the pro-part of the API precursor cloned into the plasmid pGEM4 was excised with *PstI*/*XhoI*, treated with Klenow, religated, the *SalI*/*HindIII* fragment cloned into pEMBLyex4 and fusion of the prepart with GFP and cloning of the chimera into pEMBLyex4 performed as for preproGFP. The construction and cloning of proGFP into pEMBLyex4 was performed by excising the proAPI cloned into pEMBLyex4 (Segui-Real *et al.*, 1995) with *StuI*/*EcoRI* and, after cloning the fragment into the *SnaBI*/*EcoRI* site of pGFP-N2, by cloning proGFP into pEMBLyex4 as described above. To express preproGFP under the control of the API promoter, a 1.1 kb *BamHI*-*EcoRI* fragment containing the promoter region and the prepro-part of API was excised from a genomic clone of API in YCp50 and cloned into pBluescript KS vector (Stratagene). The fragment recovered as *SacI*-*EcoRI* was then cloned into the pGFP-C-FUS plasmid (Niedenthal *et al.*, 1996), replacing the MET25 promoter and leaving the in frame fusion of prepro-API to GFP under the control of the API promoter.

DNA mutagenesis

The substitution of Gly for Ile-7 in preproAPI was performed by *in vitro* site-directed mutagenesis as described previously (Kunke, 1985), using as template the API gene cloned into the M13mp19 phage. Nuclear magnetic resonance (NMR) study of the wild and Gly-7 mutagenized prepropeptides showed that the population of the mutant peptide with a helical conformation was three to six times smaller compared with the wild peptide (Martínez *et al.*, 1997).

Subcellular fractionation studies

The cellular distributions of GFP and the GFP chimeras were studied as follows. Transformed yeast cells grown overnight to an OD₆₀₀ of 1.5 were diluted fivefold in YNB medium and induced with 2% galactose for the indicated times. Cell aliquots lysed as described previously (Yaffe and Schatz, 1984) in the presence of a cocktail of protease inhibitors (0.2 mM PMSF, 1 μ g ml⁻¹ aprotinin A, 1 μ g of leupeptin, 1 μ g ml⁻¹ pepstatin and 1.8 μ g ml⁻¹ chymostatin) were made 5% TCA, heated at 65°C for 5 min and precipitated at 4°C. The pelleted proteins were resolved by SDS-PAGE, blotted onto nitrocellulose and immunoprobed with the anti-GFP antibody or the anti-API antibody. Prestained molecular weight markers, fumarase (48.5 kDa), pyruvate kinase (58 kDa) and fructose-6-phosphate kinase (84 kDa), were from Sigma. To study the native state of preproGFP and API cells grown to an OD₆₀₀ of 1.5 were diluted five times in YNB medium, incubated for 4 h with and without 2% galactose, broken using glass beads, resuspended in 50 mM Tris/5 mM EDTA containing the protease cocktail and, upon centrifugation for 2 min at 2000 \times g, the supernatants were fractionated by centrifugation for 6 h at 51200 r.p.m. in a SW60 rotor (Beckman) in the cold, using 20–50% glycerol gradients as described previously (Kim *et al.*, 1997).

Transport was studied by analysing the protein species produced by the processing of the NH₂-prepro extension of API in the vacuole (Scott and Klionsky, 1995; Segui-Real *et al.*, 1995).

Light microscopy

The cellular morphology and the distributions of GFP and the GFP chimeras were studied by light microscopy. For this purpose, 50 ml aliquots of cell cultures grown to an OD₆₀₀ of 0.8 were overlain on 10 mm glass circles coated with polylysine, incubated for 15 min at room temperature, washed with PBS for 15 min, mounted on glass slides using Gelvatol (Monsanto) and examined in an Axiovert 135M microscope (Zeiss). Fluorescent images were recorded at 535/50 nm for FM4-64, 630/60 nm for GFP (41001 filter set, Chroma Technology) and at 500/600 nm for both GFP and FM4-64. The cells were photographed using Nomarsky optics and fluorescent microscopy. The cell morphology was studied using Nomarsky optics. Fluorescent and Nomarsky images were recorded with a Photonic Science video camera, integrated the required number of times and printed from TIFF files.

Cellular fractionation

Vacuole-enriched and vacuole-free cellular fractions were obtained as described previously (Scott and Klionsky, 1995).

Other procedures

Protein was measured by the Bradford method (Bio-Rad) using BSA as standard. Proteins blotted onto nitrocellulose were immunostained and studied using the ECL detection system according to the instructions of the supplier (Amersham). The protein bands were quantified using a computing densitometer (Molecular Dynamics, model 300A).

Acknowledgements

The *Saccharomyces cerevisiae* strain WCG-11/21a and the plasmid PWO120 carrying the insert PEP4D::His3 were the generous gift of Dr D. H. Wolf (University of Stuttgart, Germany). We thank Dr R. Cueva for kindly providing the genomic clone of API, Dr J. H. Hegemann for the gift of pGFP-C-FUS plasmid, and Dr Rosine Haguenauer for the JMR151 cells. This study was supported by grants from the Ministerio Español de Educación y Ciencia (PB94-0035) and the CE (FMRX-CT96-0058). We thank Mr J. Belio for help with the art work. The institutional support of the Fundación Ramón Areces is acknowledged.

References

- Achstetter, T., Ehmann, C., Osaki, A., and Wolf, D.H. (1984) Proteolysis in eukaryotic cells. Proteinase yscE, a new yeast peptidase. *J Biol Chem* **259**: 13344–13348.
- Ammerer, G.C., Hunter, C.P., Rothman, J.H., Saari, G.C., Valls, L.A., and Stevens, T.H. (1986) PEP4 gene of *Saccharomyces cerevisiae* encodes proteinase A, a vacuolar

- enzyme required for processing of vacuolar precursors. *Mol Cell Biol* **6**: 2490–2499.
- Baba, M., Osumi, M., Scott, S.V., Klionsky, D.J., and Ohsumi, Y. (1997) Two distinct pathways for targeting proteins from the cytoplasm to the vacuole/lysosome. *J Cell Biol* **139**: 1687–1695.
- Chang, Y.H., and Smith, J.A. (1989) Molecular cloning and sequencing of genomic DNA encoding aminopeptidase I from *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **264**: 6979–6983.
- Chapman, R.E. (1994) Vacuolar sorting. Tracking down an elusive receptor. *Curr Biol* **4**: 1019–1022.
- Distel, B., Al, E.J.M., Tabak, H.F., and Jones, E.W. (1983) Synthesis and maturation of the yeast vacuolar enzymes carboxypeptidase Y and aminopeptidase I. *Biochim Biophys Acta* **714**: 128–135.
- Feldheim, D., and Sheckman, R. (1994) Sec72p contributes to the selective recognition of signal peptides by the selective polypeptide translocation complex. *J Cell Biol* **126**: 935–943.
- Harding, T.N., Hefner-Gravink, A., Thumm, M., and Klionsky, D.J. (1996) Genetic and phenotypic overlap between autophagy and the cytoplasm to vacuole protein targeting. *J Biol Chem* **271**: 17621–17624.
- Heinemeyer, W., Kleinschmidt, J.A., Saidowsky, J., Esche, R.C., and Wolf, D.H. (1991) Proteinase yscE, the yeast proteasome/multicatalytic-multifunctional proteinase: mutants unravel its function in stress induced proteolysis and uncover its necessity for cell survival. *EMBO J* **10**: 555–562.
- Heinemeyer, W., Gruhler, A., Möhrle, V., Mahé, Y., and Wolf, D.H. (1993) PRE2, highly homologous to the human major histocompatibility complex-linked RING10 gene, codes for a yeast proteasome subunit necessary for chymiotryptic activity and degradation of ubiquitinated proteins. *J Biol Chem* **268**: 5115–5120.
- Hemmings, B.A., Zubenko, G.S., Hasilik, A., and Jones, E.W. (1981) Mutants defective in processing of an enzyme located in the lysosome-like vacuole of *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci USA* **18**: 233–270.
- Jones, E.W. (1984) The synthesis and function of proteases in *Saccharomyces cerevisiae*: genetic approaches. *Annu Rev Genet* **18**: 233–270.
- Jones, E.W. (1991) Tackling the protease problem in *Saccharomyces cerevisiae*. *Methods Enzymol* **194**: 428–453.
- Kim, J., Scott, S.V., Oda, M.N., and Klionsky, D.J. (1997) Transport of a large oligomeric protein by the cytoplasm to vacuole targeting pathway. *J Cell Biol* **137**: 609–618.
- Kleinschmidt, J.A., Escher, C., and Wolf, D.H. (1988) Proteinase yscE of yeast shows homology with the 20 S cylinder particles of *Xenopus laevis*. *FEBS Lett* **239**: 35–40.
- Klionsky, D.J. (1998) Nonclassical protein sorting to the yeast vacuole. *J Biol Chem* **273**: 10807–10810.
- Klionsky, D.J., Cueva, R., and Yaver, D.S. (1992) Aminopeptidase I of *Saccharomyces cerevisiae* is localized to the vacuole independent of the secretory pathway. *J Cell Biol* **119**: 287–299.
- Kunkel, T.A. (1985) Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection. Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection. *Proc Natl Acad Sci USA* **82**: 488–492.

- Martinez, E., Jimenez, M.A., Segui-Real, B., Vandekerkhove, J., and Sandoval, I.V. (1997) Folding of the presence of pAPI into an amphipathic helix determines transport of the protein from the cytosol to the vacuole. *J Mol Biol* **267**: 1124–1138.
- Ng, D.T.W., Brown, D., and Walter, P. (1996) Signal sequences specify the targeting route to the endoplasmic reticulum membrane. *J Cell Biol* **134**: 269–278.
- Niedenthal, R.K., Riles, L., Johnston, M., and Hegemann, J.H. (1996) Green fluorescent protein as a marker for gene expression and subcellular localization in budding yeast. *Yeast* **12**: 773–786.
- Oda, M.N., Scott, S.V., Hefner-Gravink, A., Caffarelli, A.D., and Klionsky, D.J. (1996) Identification of a cytoplasm to vacuole targeting determinant in aminopeptidase I. *J Cell Biol* **132**: 999–1010.
- Schlumpberger, M., Schaeffer, E., Straub, M., Bredschneider, M., Wolf, D.H., and Thumm, M. (1997) AUT1, a gene essential for autophagocytosis in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol* **179**: 1068–1076.
- Scott, S.V., and Klionsky, D.J. (1995) *In vitro* reconstitution of cytoplasm to vacuole protein targeting in yeast. *J Cell Biol* **131**: 1727–1735.
- Scott, S.V., Hefner-Gravink, A., Morano, K.A., Noda, T., Oshumi, Y., and Klionsky, D.J. (1996) Cytoplasm to vacuole targeting and autophagy employ the same machinery to deliver proteins to the yeast vacuole. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**: 12304–12308.
- Scott, S.V., Baba, M., Oshumi, Y., and Klionsky, D.J. (1997) Aminopeptidase I is targeted to the vacuole by a non classical vesicular mechanism. *J Cell Biol* **138**: 37–44.
- Segui-Real, B., Martinez, M., and Sandoval, I.V. (1995) Yeast aminopeptidase I is post-translationally sorted from the cytosol to the vacuole by a mechanism mediated by its bipartite N-terminal extension. *EMBO J* **14**: 5476–5484.
- Stack, J.H., and Emr, S.D. (1993) Genetic and biochemical studies of protein sorting to the yeast vacuole. *Curr Opin Cell Biol* **5**: 641–646.
- Trumbly, R., and Bradley, G. (1983) Isolation and characterization of aminopeptidase mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol* **156**: 36–48.
- Woolford, C.A., Daniels, L.B., Park, F.J., Jones, E.W., Van Arsdell, J.N., and Innis, M.A. (1986) The PEP4 gene encodes an aspartyl protease implicated in the posttranslational regulation of *Saccharomyces cerevisiae* vacuolar hydrolases. *Mol Cell Biol* **6**: 2500–2510.
- Yaffe, M.P., and Schatz, G. (1984) Two nuclear mutations that block mitochondrial protein import in yeast. *Proc Natl Acad Sci USA* **81**: 4819–4823.