



## UvA-DARE (Digital Academic Repository)

### Glucose transport in *Saccharomyces cerevisiae* effects on growth and metabolism

Ye, L.

**Publication date**  
1999

[Link to publication](#)

#### **Citation for published version (APA):**

Ye, L. (1999). *Glucose transport in Saccharomyces cerevisiae effects on growth and metabolism*.

#### **General rights**

It is not permitted to download or to forward/distribute the text or part of it without the consent of the author(s) and/or copyright holder(s), other than for strictly personal, individual use, unless the work is under an open content license (like Creative Commons).

#### **Disclaimer/Complaints regulations**

If you believe that digital publication of certain material infringes any of your rights or (privacy) interests, please let the Library know, stating your reasons. In case of a legitimate complaint, the Library will make the material inaccessible and/or remove it from the website. Please Ask the Library: <https://uba.uva.nl/en/contact>, or a letter to: Library of the University of Amsterdam, Secretariat, Singel 425, 1012 WP Amsterdam, The Netherlands. You will be contacted as soon as possible.

## Summary

**Chapter 1** of this thesis gives an introduction and some background information on glucose transport, glucose repression and control and regulation of glucose metabolism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, which are the main topics of this thesis.

**Chapter 2** studies the kinetic and physiological behavior of a selected hexose transporter by genetically fusing Hxt2 with the green fluorescent protein (GFP). Hxt2 and Hxt2::GFP show biphasic uptake kinetics with a main low-affinity component ( $K_m = 15$  and  $13$  mM, respectively) and a minor high-affinity component ( $K_m = 0.25$  mM). The catalytic-center activity of the Hxt2::GFP molecule *in vivo* is estimated as  $65\text{ s}^{-1}$  at  $30\text{ }^\circ\text{C}$ , from the fluorescence level and transport kinetics, the first determination ever of the turnover number of a glucose transporter in yeast. Using the Hxt2::GFP fusion protein as a quantitative reporter, Hxt2 expression, abundance, and localization within the yeast cell are observed through fluorimetric and spectrophotometric techniques. Induced by low glucose concentration, the Hxt2::GFP fluorescence is localized to the plasma membrane. When the induced cells are treated with high glucose, the Hxt2::GFP fusion protein is quickly redistributed to the vacuole. Our data show that under inducing conditions the hexose transporter is transcribed in the nucleus, translated at the endoplasmic reticulum, and delivered via secretory vesicles to the plasma membrane, then removed via endocytosis and degraded in the vacuole.

**Chapter 3** compares the expression of *HXT7::GFP* in the wildtype *S. cerevisiae* strain MC996A with that in the *HXT7*-only strain RE607B. The effect of glucose repression on the strains containing the Hxt7::GFP fusion proteins is also compared. The expression of the Hxt7::GFP fusion protein is induced by low-glucose concentrations. High glucose concentrations repress Hxt7::GFP expression in the wildtype strain, but this repression is less complete in the *HXT7*-only strain. The glucose transport kinetics of Hxt7 and Hxt7::GFP are fitted to a single-component transport system and the results confirm that Hxt7 and Hxt7::GFP are high-affinity transporters with a  $K_m$  of about  $2$  mM. The catalytic-center activity of the Hxt7::GFP molecule is determined to be about  $200\text{ s}^{-1}$  at  $30\text{ }^\circ\text{C}$ .

**Chapter 4** reports the construction of a set of *S. cerevisiae* strains with variable expression of the Hxt7 protein, which is the most abundantly expressed high-affinity transporter in wildtype yeast strains. By partial deletion of the *HXT7* promoter *in vitro* and integration of the gene into the genome of an *hxt1 - hxt7 gal2* deletion strain, the expression level of *HXT7* and the phenotypes of different strains with different promoter length and different gene copy number are investigated. A  $149$  bp DNA region, situated between  $346$  and  $495$  bp  $5'$  of the *HXT7* open reading frame, appears to be essential for *HXT7* expression and growth on glucose.

According to the theory of Metabolic Control Analysis, the control of an enzyme on the steady-state flux through a metabolic pathway is expressed quantitatively by a control coefficient. When all other enzyme activities are kept constant, the relative change of the flux divided by the relative change of the activity of this enzyme is defined as the control coefficient. Control of a metabolic pathway is distributed amongst all steps of the pathway; the sum of the control coefficients in a pathway is 1. The value of the control coefficient reflects the level of control of this enzyme on the flux. If an enzyme has a flux control coefficient of 1, it is the rate-limiting step of the pathway. The distribution of the flux control among the pathway enzymes is determined by their kinetic properties. By modulating the amount of an enzyme in the cell, its activity varies and this results in a certain modulation of the total flux under steady-state conditions. In order to understand further the role of hexose transport in regulation and control of glycolysis, alteration of hexose transporter expression levels by promoter deletion is applied in this thesis as an approach to the determination of the control coefficient of glucose transport for both glycolytic flux and growth rate.

Metabolic Control Analysis is applied in **Chapter 5** to determine the effect of the glucose transport capacity on various physiological properties by using the promoter-deletion strain described in chapter 4. The differences in *HXT7* expression result in reproducible differences in the glucose transport activity of the strains. The growth rate of these strains on glucose is correlated with their transport activity. The glucose transport capacity increases with higher levels of *HXT7* expression. The control coefficients of glucose transport with respect to glucose flux and growth rate are 0.90 and 0.54, respectively. At high extracellular glucose concentrations both invertase activity and the rate of oxidative glucose metabolism increase considerably with decreasing glucose transport capacity, indicative of release from glucose repression. It is concluded that the intracellular glucose concentration is the most suitable candidate for the signal molecule inducing glucose repression. In addition, both in the *HXT7*-only strains and in the wildtype strain, glucose transport exerts a high control on glycolytic flux.

In **Chapter 6**, we investigate the regulation of hexose transport at the level of transcription of the *HXT7* hexose transporter gene. The characteristics of the *HXT7* promoter and various promoter segments are analyzed using *HXT7* promoter-*CYC1*-lacZ fusions. The 149 bp region described in chapter 4, is found to contain an activator sequence for *HXT7* expression, working together with other elements downstream of it in the *HXT7* promoter. The putative *HXT7* promoter binding elements are also discussed.

In **Chapter 7**, a general discussion of our findings in the present studies is provided. A couple of proposals for further research are put forward.

## Samenvatting

**Hoofdstuk 1** van dit proefschrift geeft een inleiding en enige achtergrondinformatie over glucose transport, glucose repressie, en over controle en regulatie van glucose metabolisme in de gist *Saccharomyces cerevisiae*, wat de belangrijkste onderwerpen van dit proefschrift zijn.

**Hoofdstuk 2** beschrijft het onderzoek naar de kinetische en fysiologische eigenschappen van een geselecteerde hexose transporter door middel van genetische fusie van Hxt2 met het green fluorescent protein (GFP). Hxt2 en Hxt2::GFP vertonen bifasische opname kinetiek met een sterke lage affiniteits component ( $K_m = 15$  and  $13$  mM, respectievelijk) en een minder sterke hoge affiniteits component ( $K_m = 0.25$  mM). Met behulp van het fluorescentie nivo en de transport kinetiek kon de *in vivo* activiteit van het catalytische centrum van het Hxt2::GFP molecuul worden geschat op  $65 \text{ s}^{-1}$  bij  $30^\circ\text{C}$ , de eerste bepaling ooit van een turnover getal van een glucose transporter in gist. Door gebruik te maken van het Hxt2::GFP fusie eiwit als een kwantitatieve boodschapper, is de expressie, de hoeveelheid, en lokalisatie van Hxt2 in de gistcel gemeten door middel van fluorimetrische en spectrofotometrische technieken.. De fluorescentie van Hxt2::GFP is in het plasma membraan gelocaliseerd als deze wordt geïnduceerd door een lage concentratie glucose. Zodra de geïnduceerde cellen worden behandeld met glucose, wordt het Hxt2::GFP fusie eiwit snel gereistribueerd naar de vacuole. Onze data laten zien dat onder inducerende condities de hexose transporter getranscribeerd wordt in de kern, getransleerd wordt in het endoplasmatisch reticulum, via secretory vesicles in het plasma membraan terecht komt en vervolgens wordt verwijderd via endocytose en wordt afgebroken in de vacuole.

**Hoofdstuk 3** geeft een vergelijking van de expressie van *HXT7::GFP* in de wild type *S. cerevisiae* stam, MC996A met die in een stam waarin Hxt7 als enige hexose transporter tot expressie komt, RE607B. Het effect van glucose repressie op de stammen met de Hxt7::GFP fusie eiwitten bevatten wordt ook vergeleken. De expressie van het Hxt7::GFP fusie eiwit wordt geïnduceerd door lage glucose concentraties. Hoge concentraties glucose represseren de Hxt7::GFP expressie in de wilde type stam, echter in de stam waarin alleen Hxt7 tot expressie komt is deze repressie minder volledig. De glucose transport kinetiek van Hxt7 en Hxt7::GFP is gefit naar een één-components systeem en de resultaten bevestigen dat Hxt7 en Hxt7::GFP hoge affiniteits transporters zijn met een  $K_m$  van ongeveer  $2$  mM. De activiteit van het catalytische centrum van het Hxt7::GFP molecuul werd geschat op ongeveer  $200 \text{ s}^{-1}$  bij  $30^\circ\text{C}$ .

**Hoofdstuk 4** beschrijft de constructie van een verzameling *S. cerevisiae* stammen met een variabele expressie van het Hxt7 eiwit, de belangrijkste hoge affiniteits transporter in wilde type gistcellen. Door middel van gedeeltelijke deletie van de *HXT7* promoter *in vitro* en integratie van het gen in het genoom van een *hxt1 - hxt7 gal2* deletie stam, wordt het expressie-nivo van *HXT7* en het phenotype van de verschillende stammen met verschillende promotor lengtes en verschillend aantal kopiën van het gen onderzocht. Een stukje DNA van

149 bp, gelegen tussen 346 en 495 bp 5' van het *HXT7* open reading frame, lijkt noodzakelijk voor *HXT7* expressie en groei op glucose.

Volgens de theorie van de Metabole Controle Analyse wordt de controle van een enzym op de steady state flux door een metabool pad, kwantitatief uitgedrukt door een controle coëfficiënt. De controle coëfficiënt is gedefinieerd als de relatieve verandering van de flux gedeeld door de relatieve verandering van de activiteit van dit enzym, waarbij alle andere enzym activiteiten constant worden gehouden. De controle over een metabool pad is verdeeld over alle stappen van het pad; de som van de controle coëfficiënten is 1. De waarde van de controle coëfficiënt toont de mate van controle van dit enzyme op de flux. Als een enzym een flux controle coëfficiënt heeft van 1 dan is het de snelheids-bepalende stap van het metabole pad. De verdeling van de flux controle over de enzymen van het pad wordt bepaald door de kinetische eigenschappen van de enzymen. Door de hoeveelheid van een enzym in de cel en daarbij de activiteit te veranderen zal de totale flux onder steady state condities veranderen. Om de rol van hexose transport op de regulatie en controle van de glycolyse beter te begrijpen, wordt in dit proefschrift het expressie nivo van de hexose transporter gevarieerd door middel van promoter deletie om vervolgens de controle coefficient van glucose transport op zowel de glycolytische flux als de groei te bepalen.

In **Hoofdstuk 5** wordt de Metabole Controle Analyse toegepast om met behulp van de promoter-deletie stammen beschreven in hoofdstuk 4, het effect van de glucose transport capaciteit op verschillende fysiologische eigenschappen te bepalen. De verschillen in de expressie van *HXT7* resulteren in reproduceerbare verschillen in de glucose transport activiteit van de stammen. De groeisnelheid van deze stammen is gecorrleerd aan hun transport activiteit. De glucose transport capaciteit neem toe naarmate de *HXT7* expressie toeneneemt. De controle coëfficiënten van glucose transport op respectievelijk de glucose flux en de groeisnelheid zijn respectievelijk, 0.90 en 0.54. Bij een hoge extracellulaire glucose concentratie nemen zowel de invertase activiteit als de snelheid van het oxidatief metabolisme aanzienlijk toe met een afnemende glucose transport capaciteit, wat duidt op een afname van glucose repressie. Er is geconcludeerd dat de intracellulaire glucose concentratie de meest geschikte kandidaat is voor de inductie van glucose repressie. Bovendien is aangetoond dat zowel in de stammen waarin alleen *Hxt7* tot expressie komt als in de wilde type stam glucose transport een hoge controle op de lycolytische flux heeft.

In **Hoofdstuk 6**, onderzoeken we de regulatie van hexose transport op het nivo van de transcriptie van het *HXT7* transporter gen. De karakteristieken van de *HXT7* promoter en verscheidene promoter segmenten zijn geanalyseerd met behulp van *HXT7* promoter-*CYC1-lacZ* fusies. In het 149 bp gebied zoals beschreven in hoofdstuk 4 is een activator sequentie voor *HXT7* expressie gevonden. Deze werkt samen met andere elementen stroomafwaarts in de *HXT7* promoter. Verder worden mogelijke *HXT7* promoter bindingselementen bediscussieerd.

**Hoofdstuk 7** geeft een algemene discussie van onze bevindingen in dit onderzoek. Enkele voorstellen voor toekomstig onderzoek worden naar voren gebracht.