

Tesis de Posgrado

Transporte de L-Leucina en Saccharomyces Cerevisiae

Stella, Carlos Alberto

1990

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias
Químicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Stella, Carlos Alberto. (1990). Transporte de L-Leucina en Saccharomyces Cerevisiae. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2378_Stella.pdf

Cita tipo Chicago:

Stella, Carlos Alberto. "Transporte de L-Leucina en Saccharomyces Cerevisiae". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1990.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2378_Stella.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

TRANSPORTE DE L-LEUCINA EN SACCHAROMYCES CEREVISIAE.

CARLOS ALBERTO STELLA

DIRECTOR DE TESIS: DRA. EUGENIA H. RAMOS

LUGAR DE TRABAJO: DEPARTAMENTO DE BIOQUIMICA.
FACULTAD DE MEDICINA.
UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES.

TESIS PARA OPTAR AL TITULO DE
DOCTOR EN CIENCIAS QUIMICAS

1990

2378.
y. 2

AGRADECIMIENTOS

Muchas son las personas a las que quiero extender mi agradecimiento por la realización de la presente Tesis

La Dra. Eugenia H. Ramos me dió la oportunidad de iniciarme en la investigación científica, brindándome su orientación y confianza en la dirección de este trabajo.

El Dr. Natalio Kotliar me enseñó a realizar los primeros experimentos y posteriormente, su presencia en el laboratorio del Dr. J.R. Mattoon, Universidad de Colorado, USA, posibilitó un intercambio constante de informaciones y opiniones.

Con la Dra. Susana Salceda y el Lic. Daniel Sáenz compartimos muchos momentos agradables en el laboratorio y en Reuniones Científicas. Además Susana me ayudó constantemente en cuanto le fuera posible. La Dra. Lucía Conches prestó una excelente asistencia técnica y fue para mí un ejemplo de actividad y eficiencia.

La Sra. Irene B. de López colaboró con atención y cuidado en la preparación de los cultivos.

Debido a su visita a nuestro país tuve oportunidad de conocer el Dr. Ladislav Kováč y escuchar sus conferencias sobre levaduras. Además mantuvimos interesantes conversaciones con respecto al papel de la ciencia y la educación en la sociedad actual.

Finalmente, que esta Tesis esté al alcance de un lector se debe a la paciencia, esmero y cuidado mostrado por la Sra. Isabel Burgos (Isabel) desde mi primer día de Beca en la confección de gráficos y copiado de mis textos.

a mi padre,
Antonio Raúl Stella

a mi madre,
Vicenta Garmendia

ABREVIATURAS

ATPasa	Adenosina trifosfatasa.
BrEt	Bromuro de etidio.
CCCP	Carbonilcianida 3-clorofenildrazona.
C _i /C _e	Relación de concentración interna a externa.
$\Delta\tilde{\mu}_H^+$	Gradiente electroquímico de protones.
ΔpH	Gradiente de pH.
$\Delta\psi$	Potencial eléctrico de membrana.
DESE	Dietilstilbestrol.
DNP	2,4-dinitrofenol.
EDTA	Acido etilendiaminotetracético.
FHK	Ftalato ácido de potasio.
GAP	Permeasa general de aminoácidos.
J _{max}	Velocidad máxima de transporte para el sistema
K _T	Concentración de sustrato para alcanzar la mitad de la velocidad máxima del sistema trans <u>portador</u> .
pH _e	pH externo.
pH _i	pH interno.
p.s.cél.	Peso seco de células.
TFL	L-trifluorleucina.
TPP ⁺	Tetrafenilfosfonio.

INDICE

	Pág.
INTRODUCCION	1
1.1. LAS LEVADURAS COMO SISTEMA MODELO EN LA BIOQUIMICA.	2
1.2. CARACTERISTICAS ESTRUCTURALES DE LAS LEVADURAS.	4
1.3. CRECIMIENTO DE LAS CELULAS DE LEVADURA.	5
1.3.1. Transporte de carbohidratos.	7
1.3.2. Fuentes de nitrógeno.	7
1.3.3. Transporte de vitaminas e iones.	9
1.4. SISTEMAS DE TRANSPORTE DE AMINOACIDOS.	9
1.4.1. Sistemas de transporte adaptativos.	10
1.4.1.1. Permeasa general de aminoácidos.	11
1.4.1.2. Transporte de L-prolina.	12
1.4.1.3. Transporte de L-serina.	12
1.4.2. Sistemas de transporte constitutivos.	13
1.5. REGULACION DEL PROCESO DE TRANSPORTE.	15
1.5.1. Inactivación y represión de los sistemas GAP y PUT4.	15
1.5.2. Transinhibición y retroinhibición.	18
1.5.3. Compartimentalización intracelular de los aminoácidos.	19
1.6. REQUERIMIENTOS ENERGETICOS DEL TRANSPORTE DE AMINOACIDOS.	21
1.6.1. Gradiente electroquímico de protones y magnitud de la acumulación intracelular de los aminoácidos.	21
1.6.2. Papel del potasio en el transporte de aminoácidos.	24
1.6.3. Estimulación del transporte de aminoácidos por consumo de sustratos metabolizables.	25
OBJETIVOS	26

	Pág.
MATERIALES Y METODOS	29
3.1. CEPAS DE LEVADURAS.	30
3.2. MEDIOS DE CULTIVO.	31
3.3. MANTENIMIENTO DE LAS CEPAS.	32
3.4. CURVAS DE CRECIMIENTO.	32
3.5. CONDICIONES DE CRECIMIENTO.	34
3.6. OBTENCION DE MUTANTES DEFICIENTES RESPIRATORIAS, rho ⁻ .	35
3.7. AISLAMIENTO DE MITOCONDRIAS.	36
3.8. SUSPENSION CELULAR DE TRABAJO.	39
3.9. ENSAYOS DE INCORPORACION DE L- ¹⁴ C LEUCINA Y L- ¹⁴ C CITRULINA.	39
3.10. ENSAYOS DE COMPETENCIA.	40
3.11. CINETICA DE ENTRADA DE L- ¹⁴ C LEUCINA.	40
3.12. DETERMINACION DEL PH INTERNO.	40
3.13. DETERMINACION DEL VOLUMEN DE AGUA INTRACELULAR.	41
3.14. MEDIDA DE LA SALIDA DE PROTONES.	42
3.15. DETERMINACION DE LA RADIOACTIVIDAD DE LAS MUESTRAS.	43
3.16. MEDIDA DEL CONSUMO DE OXIGENO.	43
3.17. DISEÑO EXPERIMENTAL.	44
3.18. ORIGEN Y CALIDAD DE LOS REACTIVOS EMPLEADOS.	45
RESULTADOS	46
4. SISTEMAS TRANSPORTADORES DE L-LEUCINA EN <u>S.CEREVISIAE</u> CEPA JB65.	47
4.1. INCORPORACION Y ENTRADA DE L- ¹⁴ C LEUCINA.	47
4.2. PARAMETROS CINETICOS DE LOS SISTEMAS TRANSPORTADORES.	50
4.3. ENSAYOS DE COMPETENCIA.	53
4.4. ENTRADA DE L- ¹⁴ C LEUCINA EN CELULAS PREIN- CUBADAS CON GLUCOSA E IONES AMONIO.	53

	Pág.
5. SISTEMAS TRANSPORTADORES DE L-LEUCINA EN <u>S.CEREVISIAE</u> CEPAS MMY2, MMY2/H3 y MMY2/LT1/GAP.	57
5.1. INCORPORACION Y ENTRADA DE L- ¹⁴ C LEUCINA EN CEPAS MMY2 Y MMY2/H3.	57
5.2. PARAMETROS CINETICOS DE LOS SISTEMAS TRANS- PORTADORES.	61
5.3. INCORPORACION Y ENTRADA DE L- ¹⁴ C LEUCINA EN CELULAS CRECIDAS EN MEDIO CON L-LEUCINA COMO FUENTE DE NITROGENO.	64
5.4. ENSAYOS DE COMPETENCIA.	68
5.5. INCORPORACION DE L- ¹⁴ C LEUCINA EN MITOCON- DRIAS DE LA CEPA MMY2.	74
6. SISTEMAS TRANSPORTADORES DE L-LEUCINA EN <u>S.CEREVISIAE</u> CEPA MMY2/H3/LT1 Y EN CEPAS OBTE- NIDAS DEL CRUCE MMY2/H3/LT1 X D-28.	79
6.1. INCORPORACION Y ENTRADA DE L- ¹⁴ C LEUCINA EN LA CEPA MMY2/H3/LT1.	79
6.2. PARAMETROS CINETICOS DE LOS SISTEMAS TRANS- PORTADORES.	79
6.3. ENTRADA DE L- ¹⁴ C LEUCINA EN LAS CEPAS OBTE- NIDAS DEL CRUCE MMY2/H3/LT1 X D-28.	83
7. TRANSPORTE DE L-LEUCINA Y GRADIENTE DE PROTO- NES EN CEPAS MUTANTES DEFICIENTES RESPIRATO- RIAS.	87
7.1. INCORPORACION Y ENTRADA DE L- ¹⁴ C LEUCINA EN CEPAS JB65 rho ⁻ .	87
7.2. PARAMETROS CINETICOS DE LOS SISTEMAS TRANS- PORTADORES.	88
7.3. SALIDA DE PROTONES EN CELULAS CON CONSUMO DE GLUCOSA.	92

	Pág.
7.4. EFECTO DEL 2,4-DINITROFENOL SOBRE LOS VALORES DE ENTRADA DE L- ¹⁴ C LEUCINA Y EL PH INTERNO.	94
7.5. INCORPORACION Y ENTRADA DE L- ¹⁴ C LEUCINA EN LAS CEPAS MMY2/H3 Y MMY2/H3 rho ⁻ .	97
8. EFECTO DE LA CONCENTRACION DE PROTONES DEL MEDIO SOBRE LA ACTIVIDAD DE LOS SISTEMAS TRANSPORTADORES GAP, S ₁ Y S ₂ .	103
8.1. ENTRADA DE L- ¹⁴ C LEUCINA A DIFERENTES VALORES DE PH EXTERNO.	103
8.2. EFECTO DEL PH EXTERNO SOBRE EL PH INTERNO CELULAR. VALOR DEL GRADIENTE DE PROTONES.	109
DISCUSION	116
CONCLUSIONES	135
REFERENCIAS	139

INTRODUCCION

1.1. LAS LEVADURAS COMO SISTEMA MODELO EN LA BIOQUIMICA

De todos los animales que habitan el mundo, el hombre es el único que trata de comprender su entorno. En base a esa voluntad fue seleccionando una serie de métodos para, no sólo limitarse a comprenderlo o conocerlo, sino también interaccionar con él, con el fin de lograr un mejoramiento en sus propias condiciones de vida.

Esa acumulación de conocimientos y métodos, que forman parte de la ciencia, resultan ser entonces una actividad esencialmente humana. Dentro de este contexto la Bioquímica puede considerarse, no sólo como un cuerpo de conocimientos definidos por los textos o un conjunto de técnicas de laboratorio, sino mas bien, una actividad humana para explicar y comprender nuestro entorno o a nosotros mismos (1).

Las características de la ciencia conducen a los científicos, a utilizar una serie de sistemas modelos, que permiten comprobar y refutar las distintas hipótesis y principios, en condiciones en que esas determinaciones puedan ser reproducidas por otros investigadores.

En Bioquímica, algunos sistemas modelos se mostraron adecuados en circunstancias en que el desarrollo de las técnicas no permitía utilizar otros, con mayor grado de complejidad. De los sistemas existentes, los virus, las baterías y las levaduras son los de más simple manipulación y los más conocidos (2).

El hombre se familiarizó con las levaduras a través de su utilización en diversos procesos fermentativos. Los sumerios y los babilonios las utilizaron ya en el año 6000 antes de Cristo. Estos pueblos aprovecharon la capacidad de las levaduras para transformar compuestos orgánicos y obtener bebidas alcohólicas. Los egipcios las utilizaron para fermentar el pan y en el Génesis pueden encontrarse referencias a la producción de vino.

Sin embargo, en todos los casos se consideraba a la levadura como un material inerte que transmitía su inestabilidad al compuesto orgánico que transformaba. A este respecto, se puede mencionar que la síntesis de etanol en el laboratorio, por Hennell en el año 1827, no produjo el impacto alcanzado por la síntesis química de urea, por Wohler, casi un año después (3).

Fue a partir de los trabajos de Pasteur, que las levaduras comenzaron a considerarse un organismo vivo. Pasteur propuso que el proceso de fermentación proporcionaba energía a la especie en que ocurría. Esta observación condujo luego al descubrimiento del metabolismo celular por parte de Buchner en 1897, utilizando extractos de levadura, libres de células.

Las levaduras crecen en medios de cultivo simples, los que pueden modificarse para permitir la expresión del fenotipo deseado. También presentan un rápido crecimiento, pudiendo duplicar su masa en 90 minutos. De esta forma, se obtienen poblaciones homogéneas de células, que posibilitan el estudio de sus características bioquímicas y genéticas en intervalos cortos de tiempo.

Su contenido en ADN, tres veces mayor que en E.coli y casi mil veces menor que en células de vertebrados superiores, facilita la aplicación de las técnicas de ADN recombinante.

A diferencia de las bacterias, son eucariotes inferiores que poseen cromosomas contenidos en un núcleo; por lo tanto los procesos de transcripción y traducción ocurren en compartimientos físicamente separados. Esta diferencia hace que las células de levadura resulten un modelo apropiado para inferir funciones en las células de organismos eucariotes superiores.

De las diferentes especies de levaduras, la más estudiada y conocida, desde el punto de vista bioquímico y genético, es la Saccharomyces cerevisiae. Estas levaduras obtienen la energía para su crecimiento tanto en condiciones

anaeróbicas como aeróbicas.

Si bien es cierto que estas células llevan a comprender la función de los genes en organismos más complejos, cada conclusión debe ser eventualmente comprobada directamente en el organismo superior.

1.2. CARACTERISTICAS ESTRUCTURALES DE LAS LEVADURAS

Las células de levadura presentan las características de compartimentalización interna de las células eucariotes; las propiedades y funciones de los componentes de la barrera de permeabilidad del núcleo celular, sus mitocondrias y las vacuolas han sido extensamente estudiadas.

Rodeando la membrana citoplasmática, las células poseen una gruesa y compleja mezcla de proteínas alargadas, entrecruzadas con polisacáridos que constituyen la pared celular (4). La existencia de esta barrera impidió que se realizaran algunas investigaciones en las células enteras. Sin embargo, esta desventaja puede revertirse por la remoción de la pared mediante un tratamiento con enzimas líticas, originando células que son completamente libres de pared, que se denominan protoplastos. Si conservan restos de pared se denominan esferoplastos.

La nueva estructura al perder la pared, que regula entre otras propiedades su estabilidad osmótica, debe mantenerse en un medio con alta concentración de un soluto no permeable.

Entre la pared y la membrana citoplasmática se encuentra una región denominada espacio periplasmático que contiene enzimas, que intervienen en la degradación de moléculas y proteínas, que participan en procesos de transporte a través de la barrera de permeabilidad (5-11).

Cada célula de levadura puede contener entre 10 y 50 mitocondrias distribuidas a través de su citoplasma, repre-

sentando aproximadamente el 10 por ciento del peso celular. Una característica de las levaduras es que pueden introducirse mutaciones y transformar el material genético de sus mitocondrias y obtener mutantes deficientes respiratorias que carecen de citocromos, por lo tanto de la operación de la cadena de transporte de electrones y de la fosforilación oxidativa acoplada. La mutación no afecta el ADN nuclear (12).

En esas mutantes la energía metabólica se obtiene por el proceso glucolítico citoplasmático. A su vez, las mitocondrias aisladas pueden introducirse en protoplastos provenientes de levaduras que carecen de mitocondrias funcionales (13), estudiándose de esta forma la genética de las mismas con técnicas similares a las usadas para estudiar genes nucleares.

Dentro de las vacuolas las levaduras acumulan aminoácidos principalmente básicos, en forma muy eficiente. Desde el punto de vista fisiológico esta capacidad resulta importante cuando se someten las células a una condición de ayuno nitrogenado. En ese caso, la salida de los aminoácidos acumulados permite su utilización como fuente de nitrógeno, en diversos procesos metabólicos (14,15).

Las levaduras contienen además peroxisomas que entre otras funciones, debido a la presencia de catalasa, impiden que el peróxido de hidrógeno alcance niveles tóxicos dentro de la célula (16).

Algunas de las proteínas que forman parte del citoesqueleto de las células de los organismos superiores, también se han encontrado en las levaduras (17).

1.3. CRECIMIENTO DE LAS CELULAS DE LEVADURA

Como organismos heterótrofos, las células de levadura utilizan carbohidratos y una variedad de otros compuestos

orgánicos como nutrientes. De todos estos compuestos, derivan los esqueletos carbonados, necesarios para sintetizar los constituyentes celulares y la energía requerida por las reacciones biosintéticas.

El transporte de estos nutrientes exógenos, al interior de las células, constituye entonces el primer paso para su utilización posterior. Los nutrientes se incorporan por procesos de difusión simple, difusión facilitada o de transporte activo.

El primer proceso no es muy común como mecanismo de transporte en levaduras y está gobernado por la ley de acción de masas. La difusión facilitada, es mediada por una proteína transportadora, que participa en el proceso de transporte a través de la membrana citoplasmática. El tercer mecanismo, en forma análoga al segundo proceso, es mediado por un transportador. Una característica que lo distingue de los otros mecanismos es el requerimiento o aporte de energía, que hace posible la acumulación de metabolitos en la célula, contra gradientes de concentración. Los nutrientes pueden alcanzar concentraciones 25 a 30 veces mayores que las del medio externo (18). Como resultado del acoplamiento energético, los sistemas de transporte activo son sensibles a los inhibidores del metabolismo energético de la célula.

El conocimiento de los sistemas de transporte ha sido posible a través de aproximaciones biofísicas, bioquímicas y genéticas.

En los estudios bioquímicos, las determinaciones han sido usualmente analizadas con alguna forma de ecuación de Michaelis-Menten y comparando las modificaciones observadas en los parámetros cinéticos del proceso de entrada en presencia de competidores e inhibidores.

La aproximación genética es muy importante en levaduras, teniendo en cuenta la posibilidad de obtener y aislar mutantes deficientes en transporte. Utilizando mutantes apropiadas, es posible indagar y conocer las características del proceso en casos donde funcionen múltiples sistemas de trans

porte. Debido a que el transporte es un proceso complejo, que requiere la participación de productos de varios genes, no puede asumirse directamente que la mutación afecte, solamente a la proteína de transporte.

1.3.1. Transporte de carbohidratos

Diversos carbohidratos son utilizados por las células de levadura como fuente de carbono. Los sistemas de transporte más estudiados son los correspondientes a los mono y disacáridos; en particular se han caracterizado los sistemas que median el transporte de D-glucosa, D-fructosa, D-manosa, D-galactosa, sacarosa, maltosa y trehalosa (19-24).

Aunque el acetato, lactato, piruvato, glicerol y etanol, se utilizan como fuente de carbono, por las células de S.cerevisiae, sus sistemas de entrada no han sido suficientemente estudiados (18).

1.3.2. Fuentes de nitrógeno

El nitrógeno es un elemento esencial para el metabolismo celular, que se encuentra en muchos compuestos simples y en casi todas las macromoléculas de las células vivas. No debe resultar sorprendente entonces, que una elevada proporción de la actividad celular está relacionada con la incorporación y asimilación de nitrógeno.

La glutamina es el dador más importante de nitrógeno para la levadura y muchas otras células eucariotes. Cuando se encuentra presente en un medio de cultivo, o en su reemplazo glutamato o amonio, sirve preferentemente como fuente de nitrógeno (25).

Si estas fuentes de nitrógeno están ausentes o en cantidades limitadas, la célula expresa genes cuyos productos le permiten utilizar muchas y diversas fuentes de nitrógeno

que incluyen nitritos, nitratos, bases púricas, ácidos nucleicos, proteínas y aminoácidos (25-28).

La utilización de los aminoácidos del medio externo, como fuente de nitrógeno o como componentes básicos de las proteínas, involucra su transporte al interior celular, seguida por una remoción del grupo α -amino (desaminación y transaminación) o una incorporación directa a proteínas.

En el caso del glutamato, éste puede ser utilizado como fuente de nitrógeno y también de carbono, además de proveer energía. A partir del glutamato la célula obtiene amonio y α -cetoglutarato. Este último compuesto, puede ser metabolizado en el ciclo de los ácidos tricarbónicos, para producción de energía e intermediarios en la síntesis de cadenas hidrocarbonadas (29).

Las células de levadura poseen dos glutamato deshidrogenasas, una NAD^+ -dependiente y otra NADP^+ -dependiente. La primera tiene alta actividad en medios en que el glutamato u otros aminoácidos son utilizados como fuente de nitrógeno; en ese caso exhibe las características de una enzima catabólica. En cambio, la glutamato deshidrogenasa- NADP^+ actúa en reacciones biosintéticas (29).

El glutamato es a su vez, uno de los productos de las reacciones de transaminación de muchos aminoácidos, los cuales reaccionan con el α -cetoglutarato para producir un α -cetóácido y glutamato; de ahí el papel central del glutamato en la distribución celular del grupo α -amino y la utilización del nitrógeno.

El ión amonio constituye otra fuente de nitrógeno para las células de levaduras. Para el conocimiento de su transporte Roon, H. y Larimore, F. usaron metilamina que no es metabolizada por las células (30-33).

La incorporación de metilamina es mediada por un sistema de transporte activo con un pH óptimo de 6,0-6,5, sugiriendo que es el ión amonio cuaternario el acumulado. El sistema exhibe un K_M de valor igual a 0,2 mM y concentra la metilamina 850-1000 veces. Para ser funcional, el proceso re-

quiere glucosa y es inhibido por carbonilcianida 3-clorofenilhidrazona (CCCP), 2,4-dinitrofenol (DNP) y Dio-9. Se ha propuesto la existencia de dos o tres sistemas para el transporte de amonio, teniendo en cuenta la obtención de gráficos bifásicos de Lineweaver-Burk, para la velocidad de incorporación en función de concentraciones crecientes de metilamina y el aislamiento de mutantes resistentes a metilamina. El bajo K_M , del sistema transportador, le permite estar siempre saturado en medios con amonio como fuente de nitrógeno y su concentración externa sólo puede resultar limitante cuando su valor es menor a 20 mM (15).

1.3.3. Transporte de vitaminas e iones

Las células de S.cerevisiae poseen además sistemas de transporte que le permiten acumular vitaminas, como tiamina, biotina, riboflavina, inositol y colina (34-41).

Los aniones inorgánicos fosfato y sulfato (42-44) y los cationes divalentes magnesio, manganeso, cobalto, zinc, níquel, calcio y estroncio son transportados por sistemas de transporte activo (45). El ión potasio posee sistemas de transporte, siendo además cotransportado con el anión fosfato (46).

El transporte de iones amonio puede estar asociado con el de fosfato y/o la incorporación de sulfato, ya que este anión es también cotransportado con una variedad de cationes. Se ha sugerido a éste como uno de los tres sistemas propuestos para el ión amonio (47).

1.4. SISTEMAS DE TRANSPORTE DE AMINOACIDOS

En microorganismos eucariotes, los sistemas de transporte parecen representar un compromiso entre los sistemas de

bacterias, con una limitada especificidad, para aminoácidos individuales o pequeños grupos de aminoácidos, estructuralmente relacionados, y los sistemas en células animales, de amplia especificidad. Los microorganismos eucariotes, generalmente poseen dos tipos de sistemas de transporte para aminoácidos: sistemas que son específicos para un aminoácido o un grupo de aminoácidos estructuralmente relacionados y sistemas inespecíficos, que transportan un gran número de aminoácidos diferentes.

La existencia de distintos sistemas de transporte, con especificidad de sustratos parcialmente superpuesta y su operación simultánea, dificulta el estudio del transporte de cada aminoácido en particular.

Los sistemas de transporte de los microorganismos eucariotes median flujos de sustratos, prácticamente unidireccionales, del medio externo al interior celular, a diferencia de lo observado en los sistemas de bacterias y de células de mamíferos (48,49).

En levaduras, el análisis cinético y los datos genéticos permiten clasificar a los sistemas de transporte de aminoácidos en dos grupos: sistemas adaptativos y sistemas constitutivos (25).

1.4.1. Sistemas de transporte adaptativos

En Saccharomyces cerevisiae, se han descrito tres sistemas de transporte en los cuales la actividad y/o la síntesis de sus componentes, está regulada por la fuente de nitrógeno del medio de cultivo. Ellos son: el sistema de la permeasa general de aminoácidos, GAP, el sistema para L-prolina, PUT4, y un sistema inducible para el aminoácido L-serina.

1.4.1.1. Permeasa general de aminoácidos

En los primeros trabajos realizados en el estudio del transporte de aminoácidos en S.cerevisiae Surdin, Y. y col. (50,51) observaron que las mismas incorporaban numerosos aminoácidos que competían entre sí en el proceso de entrada; además detectaron un alelo recesivo, aap, en otra familia de cepas en que la velocidad de entrada de todos los aminoácidos estaba disminuída. Por estos resultados los investigadores propusieron la existencia de un sistema común de transporte o permeación.

Trabajos posteriores de Grenson, M. y col, establecieron la base genética para el transporte de aminoácidos utilizando una serie de cepas isogénicas. La utilización de mutantes obtenidas a partir de una misma cepa silvestre, evita las fluctuaciones que pueden presentarse en los resultados experimentales, debido a diferencias genéticas entre diferentes cepas silvestres.

Utilizando distintas cepas (52) Grenson detectó el locus apf, y propuso la existencia de un sistema común para la entrada de la mayoría de los L y D aminoácidos, al que denominó permeasa general de aminoácidos, GAP (53).

La actividad del sistema GAP es baja en células crecidas en medios con una fuente rica de nitrógeno como amonio, glutamina o asparagina, mientras que con una fuente pobre de nitrógeno, como el aminoácido L-prolina, la actividad resulta aumentada.

El sistema GAP exhibe valores altos de V_{max} , entre 20 y 40 nmoles/min.mg proteína y tiene amplia especificidad para la mayor parte de los L y D aminoácidos básicos, neutros y ácidos. El sistema transporta preferentemente aminoácidos con el grupo α -amino no sustituido; probablemente ésta es la razón por la cual la GAP media el transporte de L-prolina con baja afinidad y transporte eficientemente análogos de aminoácidos naturales como δ -N-cloroacetil-L-ornitina o ϵ -N-butiril-L-lisina (54,55).

Las mutantes defectivas para el transporte de aminoácidos mediado por la GAP, se detectaron y seleccionaron en base a su crecimiento extremadamente lento, en L-citrulina como única fuente de nitrógeno (53) o su resistencia al análogo tóxico D-histidina, en un medio con el aminoácido L-prolina como fuente de nitrógeno (56).

1.4.1.2. Transporte de L-prolina

El aminoácido L-prolina es deficientemente transportado por la GAP. Su cinética de incorporación fue estudiada y descrita por Brandiss, M. y col, quienes demostraron que la entrada es mediada por dos sistemas (57-59), El sistema de alta afinidad exhibe para su actividad, un pH óptimo de 5,8-5,9. Su actividad y síntesis está regulada por la fuente de nitrógeno en el medio de cultivo. Dos tipos de mutantes, defectivas en el transporte de L-prolina, se aislaron en base a su resistencia a análogos tóxicos del aminoácido. Un tipo de mutantes presenta el fenotipo de la mutación apf, descrita por Grenson, M. El otro tipo, designada put, crece en forma similar a la cepa silvestre, en medios conteniendo altas concentraciones de L-prolina, (0,1%) como única fuente de nitrógeno.

Estos resultados concuerdan con la existencia de un segundo sistema de transporte, de baja afinidad, propuesto teniendo en cuenta los resultados cinéticos.

1.4.1.3. Transporte de L-serina

El sistema de transporte de L-serina es regulado por la fuente de nitrógeno del medio de cultivo, su capacidad es muy baja en presencia de amonio y aumenta sustancialmente en células crecidas con L-prolina como fuente de nitrógeno (60,61). Sin embargo, los resultados obtenidos indican

que el sistema involucrado no es el sistema GAP y que la regulación del mismo puede tener lugar en forma independiente de la presencia del sistema GAP.

1.4.2. Sistemas de transporte constitutivos

Cuando células de cepas silvestres crecen en medios conteniendo amonio como única fuente de nitrógeno, la incorporación de aminoácidos depende de varias permeasas que no están sujetas a la represión catabólica de nitrógeno (25).

En estas condiciones de crecimiento se han descrito sistemas específicos para L-arginina, L-lisina, L-histidina, L-metionina, L-leucina, L-asparagina, L-glutamina y L-glutamato (62-70). Los aminoácidos L-arginina y L-lisina comparten un sistema de transporte y además la L-lisina es transportada en forma específica por un sistema de bajo valor de K_M .

La existencia de estos sistemas independientes se confirmó utilizando mutantes designadas can1 y lyp1, aisladas en células resistentes a los análogos tóxicos de L-arginina (L-canavenina) o L-lisina (L-tiosina). Posteriormente el gen CAN1 fue aislado y clonado, mapeado sobre el brazo izquierdo del cromosoma V y se construyó un mapa genético del locus CAN1 (71-75).

Para el aminoácido L-leucina, Ramos, E. y col. han descrito, en células crecidas en medio Wickerham (48,67), la existencia de dos sistemas para el transporte del aminoácido. Un sistema de alta afinidad, baja velocidad máxima, denominado S_1 y un sistema de baja afinidad y alta velocidad máxima, denominado S_2 .

Los sistemas S_1 y S_2 están caracterizados por sus pará-

metros cinéticos K_T y J_{max} siendo este último dependiente del estado metabólico de las células. Estos sistemas pueden caracterizarse en protoplastos preparados a partir de células enteras, sin modificación en los valores de K_T (76), lo que sugiere que las entidades relacionadas con la afinidad de los sistemas están localizadas en la membrana plasmática.

El estudio de las propiedades de los sistemas de transporte demostró que el proceso de entrada involucra: 1, el reconocimiento específico de la molécula a transportar por un componente de la barrera de permeabilidad; 2, la translocación del aminoácido a través de esa barrera; 3, el acople a un sistema generador de energía libre de Gibbs y 4, la liberación del aminoácido al medio intracelular.

Además, en el estudio de los requerimientos energéticos para la incorporación de L-leucina se encontró que los sustratos capaces de activar la transferencia mitocondrial de electrones y la fosforilación oxidativa (48) estimulan el transporte concentrativo del aminoácido.

Ensayos realizados con cepas silvestres y mutantes deficientes respiratorias permitieron demostrar que en células competentes respiratorias, la mitocondria contribuye a la incorporación de L-leucina aportando compuestos de alta energía.

Como se describió, las mutantes deficientes respiratorias obtienen energía a través de la vía glucolítica. Las mutaciones presentes en las mitocondrias de estas células dan como resultado organelas carentes de citocromos $a+a_3$ y b , necesarios para el funcionamiento de la cadena de transferencia de electrones mitocondrial y la fosforilación acoplada. Estas mutaciones citoplasmáticas no muestran segregación Mendeliana durante la mitosis, que caracterizan a los genes nucleares (77,78).

1.5. REGULACION DEL PROCESO DE TRANSPORTE

La actividad de los sistemas de transporte de aminoácidos de los microorganismos eucariotes, está sujeta a dos mecanismos de regulación que involucran el proceso de biosíntesis de las proteínas componentes de los sistemas y que afectan la velocidad de los mismos.

Mientras que la represión y la inducción son, probablemente, los únicos mecanismos de regulación del primer tipo, en el segundo caso los mecanismos abarcan la inactivación, la transinhibición, la retroinhibición, la inhibición por sustrato y la regulación que se ejerce por compartamentalización intracelular de los nutrientes incorporados (25).

1.5.1. Inactivación y represión de los sistemas GAP y PUT4

Dos clases de mutantes tuvieron un papel importante en los intentos por establecer los mecanismos regulatorios de los sistemas GAP y PUT4: 1, mutantes con defectos en los locci GDHA y GDHCR y 2, mutantes defectivas en los locci MUT2, MUT4, PGR, NPR1 y PER1.

En el caso de la permeasa general de aminoácidos, GAP, no se observa actividad de la misma en células crecidas con amonio como fuente de nitrógeno, mientras que la actividad es máxima cuando el aminoácido L-prolina es la única fuente de nitrógeno del medio (53).

La disminución de la actividad de la GAP, al agregar iones amonio a un medio de cultivo, es la consecuencia de la operación de dos mecanismos regulatorios distintos, por el hecho que éstos pueden perderse separadamente, como resultado de mutaciones (15).

El mecanismo más simple para la resistencia al amonio es una disminución en la actividad de transporte del mismo, como sucede en las mutantes mep-1 en que la GAP es

activa (47).

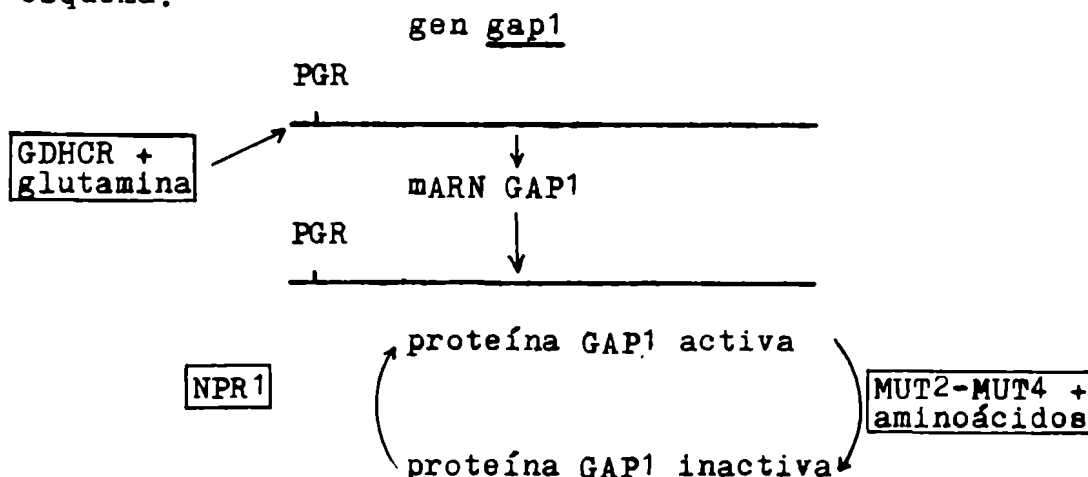
La mutación $gdhA^-$ afecta el gen estructural para la $NADP^+$ -glutamato deshidrogenasa anabólica (79). En la mutante hay una disminución del efecto del ión amonio sobre la actividad de la GAP, sugiriéndose que el α -cetoglutarato o el $NADPH$ puedan actuar como activadores del sistema, o el de $NADP^+$ como inhibidor. Sin embargo, no se observan cambios significativos en la concentración de estos posibles efectores en las mutantes $gdhA^-$ (80,81) Estos resultados han dado origen a considerar que la $NADP^+$ -glutamato deshidrogenasa pueda actuar como proteína reguladora. En cambio, las mutaciones en el locus $gdhCR$ podrían afectar un gen que codifique a un represor general. Aunque la mutación desreprime la GAP, no tiene un efecto detectable sobre la actividad, debido a que el sistema no ha sido liberado del segundo mecanismo de control (82).

Otro de los efectos de la mutación $gdhCR$ es suprimir el proceso de inactivación relacionado con la actividad de la glutamina sintetasa (83). La acumulación resultante de glutamina, en estas cepas, originaría la inhibición de la GAP. Esta idea está apoyada en que, cuando se introduce una mutación gln^{ts} , que limita la formación de glutamina debido a la termosensibilidad de la glutamina sintetasa, se restablece la actividad de la GAP, en presencia de iones amonio.

En las mutantes alteradas en los loci mut2, mut4 o pgr, en crecimiento en medio conteniendo L-prolina, el agregado de iones amonio mantiene la actividad preexistente de la permeasa, mientras que no se observan incrementos posteriores. En el caso de la mutación pgr, el efecto está restringido a la GAP y se considera que la mutación modificaría un sitio receptor para el control negativo mediado por los productos de los genes mut2 y mut4 (84).

La formación de una GAP activa requiere entonces, la integridad de dos loci genéticos sin conexión, denominados genes gap1 y npr1.

Las mutaciones en el locus gap1 inactivan específicamente a la GAP y parecen afectar el gen estructural para esta permeasa. En el caso de la mutación npr1, tiene un efecto pleiotrópico sobre permeasas sensibles al amonio (85). Los datos disponibles sobre la regulación de la GAP han sido interpretados por Grenson, M. como se muestra en el siguiente esquema:



De acuerdo a esto, en células crecidas en medio conteniendo L-prolina como fuente de nitrógeno, la GAP es sintetizada pero inactivada por los mecanismos de control MUT2-MUT4, que actúan a nivel del sitio PGR de la permeasa. Cuando las células alcanzan el estado estacionario, interviene el producto de NPR1 alcanzándose un equilibrio entre estos dos efectos.

La adición de iones amonio, en ese caso, produce una progresiva disminución en la actividad preexistente de la GAP, por el sistema MUT2-MUT4, debido a que los iones amonio o algún derivado inactivan o repriman la síntesis de la proteína de control NPR1, no excluyéndose la posibilidad que estimulen el sistema MUT2-MUT4.

Además de esta regulación por inactivación de la GAP, un segundo mecanismo regulatorio reprimiría la síntesis de la permeasa en células silvestres crecidas en medios conteniendo amonio. Esta represión parece estar mediada por GDHCR, que puede inhibir la transcripción del gen gap1 o

el procesamiento o la traducción del mRNA GAP1, o aún, alguna modificación postraducciona, necesaria para sintetizar una GAP activa. En base a los resultados obtenidos con las mutantes gln^{ts} , se considera que la glutamina puede actuar como un efector del mecanismo de represión.

En la regulación de la actividad de la permeasa de alta afinidad para L-prolina se considera que opera el mismo mecanismo de doble control que en la GAP (82,85). El aislamiento de mutantes defectivas en el transporte a través del sistema de alta afinidad, permitió determinar que la mutación afecta un locus denominado put4 (58).

La permeasa no es inducida por L-prolina, en contraste con el efecto del aminoácido sobre las dos enzimas que intervienen en el catabolismo del mismo (57,86,87).

En un estudio sobre la regulación por amonio, de la permeasa específica para L-prolina, se ha descrito un locus per1, que está involucrado en su regulación (88). Las mutaciones en este locus suprimen la inactivación de la GAP y PUT4, por agregado de amonio a células con alta actividad de los sistemas.

1.5.2. Transinhibición y retroinhibición

Además del mecanismo de represión o desrepresión de la actividad de los sistemas de transporte, las levaduras y otros microorganismos eucariotes, poseen mecanismos de regulación más generales denominados, retroinhibición y transinhibición (18). La función de estos mecanismos está relacionada con la prevención de la acumulación de muchos aminoácidos, que debido a las características unidireccionales de los sistemas de transporte, conducirían a la lisis celular.

Por el mecanismo de retroinhibición, el compuesto transportado inhibe su sistema de entrada desde el interior de la célula y la inhibición exhibe la misma especificidad

que para el sistema de transporte. Este tipo de inhibición ha sido observado para el transporte de los aminoácidos L-histidina, L-metionina, L-treonina, L-serina y ácido α -aminoisobutírico (64,65,68,60,89).

En el caso del mecanismo de transinhibición, el compuesto inhibitor comparte pocas similitudes estructurales con el sustrato del sistema de transporte inhibido. Para la permeasa general de aminoácidos, GAP, la incorporación de cualquier sustrato mediada por el sistema es inhibida cargando las células con cualquiera de los aminoácidos transportados por esta permeasa (15).

A los mecanismos mencionados, debe agregarse el de transestimulación de la actividad del sistema de entrada de un aminoácido, en células previamente enriquecidas con ese aminoácido, como fue descrito en el transporte de L-leucina en S.cerevisiae (90).

1.5.3. Compartimentalización intracelular de los aminoácidos.

Si un cultivo de S.cerevisiae es cosechado y lavado, al resuspenderlo en agua las células completan una y algunas veces dos divisiones celulares, antes que el crecimiento se detenga totalmente. Este hecho se debe a la existencia de metabolitos intracelulares almacenados, que son liberados durante períodos de ayuno.

Aplicando métodos para extraer en forma selectiva, el reservorio de metabolitos citoplasmáticos y estudiando los metabolitos liberados luego de un tratamiento hipotónico, se concluyó que en el caso de los aminoácidos el 80-90 por ciento de los mismos están localizados en vacuolas (91,92).

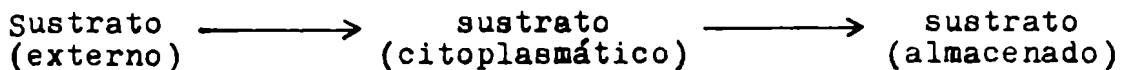
Los resultados fueron confirmados por medidas directas de la concentración de los aminoácidos, en preparaciones de vacuolas purificadas (14). Las determinaciones se realizaron después de una desintegración controlada de protoplas-

tos de manera de evitar la pérdida de sustancias de bajo peso molecular, como resultado de la expansión de la membrana de la vacuola durante la lisis osmótica.

Estos métodos permiten determinar la compartimentalización intracelular de diversos compuestos como aminoácidos, cationes y aniones inorgánicos. A partir de los análisis cuantitativos de los reservorios de aminoácidos citoplasmáticos y de vacuolas, se observó que los aminoácidos básicos están localizados, casi exclusivamente en vacuola y los aminoácidos ácidos en citosol (25). La distribución de los otros aminoácidos se encuentran en situaciones intermedias.

La diferente distribución de los aminoácidos dentro de la célula sugirió la existencia de sistemas de transporte específicos. La operación de estos sistemas fue establecida en vesículas de membrana de vacuolas (93). En las mismas se confirmó además, la existencia de una H^+ -ATPasa capaz de establecer un $\Delta\mu_H^+$ a través de la membrana, que actuaría como fuerza impulsora para el transporte de aminoácidos básicos en vacuolas intactas (94).

Los resultados expuestos permiten considerar que cada metabolito, almacenado en vacuolas, participa en dos reacciones secuenciales de transporte:



El sustrato almacenado por la organela no resulta por lo tanto accesible, desde el citosol, al sistema de transporte para ejercer los mecanismos regulatorios descritos en 1.5.2.

1.6. REQUERIMIENTOS ENERGETICOS DEL TRANSPORTE DE AMINOACIDOS

1.6.1. Gradiente electroquímico de protones y magnitud de la acumulación intracelular de aminoácidos.

Como ha expresado Kaback, H.R. (95), en el mismo sentido que el modelo de la doble hélice del ADN ha constituido la base de la genética molecular, la hipótesis quimiosmótica, formulada y refinada por Peter Mitchell (96,97) durante la década del 60, es actualmente el marco conceptual para la interpretación de una variedad de procesos bioenergéticos. En su forma más general, el concepto quimiosmótico postula que la fuerza impulsora para muchos procesos de acoplamiento energético en membranas, es un gradiente electroquímico de protones ($\Delta\tilde{\mu}_{H^+}$) compuesto por parámetros químicos y eléctricos de acuerdo a la siguiente relación:

$$\Delta\tilde{\mu}_{H^+}/F = \Delta\psi - 2,3 RT/F \Delta pH$$

donde $\Delta\psi$ representa el potencial eléctrico a través de la membrana y ΔpH es la diferencia química de la concentración de protones a través de la membrana, R es la constante de los gases, T es la temperatura absoluta, F es la constante de Faraday, $2,3 RT/F$ es igual a 58,8 mV a temperatura ambiente.

Durante la década del 70, una gran cantidad de resultados experimentales dieron un sólido apoyo a la hipótesis quimiosmótica del transporte activo en sistemas de bacterias, particularmente E.coli (98). También se demostró que el transporte activo en levaduras (99,100,101) involucra el cotransporte con protones, mientras que en células de mamíferos, el ión asociado es el sodio (102).

A las primeras observaciones de Lavoisier sobre la propiedad de las células de levadura de acidificar el medio externo, siguieron las de Pasteur, quien identificó al ácido succínico como la causa probable de ese proceso (103).

La caracterización de una H^+ -ATPasa en membranas citoplasmáticas de levaduras permitió demostrar, que éste es uno de los sistemas responsables del establecimiento del gradiente electroquímico de protones a través de la barrera de permeabilidad (104). La enzima se asemeja a las ATPasa de células de mamíferos superiores, involucradas en el transporte de iones sodio, potasio y calcio, en su sensibilidad al vanadato y por tener una subunidad catalítica de aproximadamente 100kDa (105-107). Por otro lado, se asemeja a las ATPasas F_0F_1 , en que opera como una bomba electrogénica de protones.

Además de considerarse que el gradiente generado por la H^+ -ATPasa, puede actuar como fuerza impulsora para el transporte de nutrientes cotransportados con protones, los resultados de Serrano, R. indican que la alcalinización interna y la acidificación externa resultante de la actividad, median la inducción del crecimiento celular por acción de la glucosa (108,109).

Numerosos interrogantes relacionados con los mecanismos fisiológicos y moleculares del cotransporte con protones aún no han sido aclarados. En particular, la magnitud de la dependencia, flujo de soluto-protones, ha sido establecida en pocos sistemas. Esto se debe en parte, a razones metodológicas, la medida de la relación acople flujo de soluto-protones, ha sido usualmente deducida de la alcalinización del medio extracelular, debido a que no se poseen aún métodos suficientemente exactos y rápidos para medir los cambios operados en los valores de pH intracelular. También algunos factores metabólicos introducen incertidumbre en la medida de los flujos de protones (110).

Se han establecido diferentes estequiometrías para el transporte de aminoácidos cuando las células tienen bloqueado su metabolismo energético en presencia de 2-desoxiglucosa y antimicina o ausencia de estos inhibidores y en condiciones experimentales de consumo o no de glucosa (110).

Cualquier aproximación sistemática a estos temas implica la determinación y control de los valores de pH intracelular, así como los valores de pH extracelular. Para la otra magnitud que compone el gradiente electroquímico de protones el $\Delta\psi$, las evidencias en levaduras con respecto a las células de bacterias son escasas.

La determinación del $\Delta\psi$ por acumulación de un catión lipofílico como el tetrafenilfosfonio (TFP), ampliamente utilizando en esos microorganismos, no ha permitido la obtención de resultados reproducibles en levaduras (111,112). Entre las causas que dificultan la valoración del $\Delta\psi$ en este caso se reconocen: el ligado del catión en la superficie externa, acumulación en mitocondrias y expulsión desde vacuolas, lo que lleva a una relación errónea de la distribución del catión entre el medio extracelular y el citoplasma.

Una forma de evaluar la participación de los protones en el transporte de diversos compuestos en S.cerevisiae, está basada en estimar la relación entre la diferencia de potencial electroquímico de protones y la acumulación observada experimentalmente para el sustrato transportado. La máxima relación de acumulación, considerando que el sustrato es transportado solo formando un complejo con el ión y el transportador, debería obedecer la siguiente ecuación:

$$C_i/C_e = e^{- (n + z) F\Delta\psi/RT} \left([H^+]_e / [H^+]_i \right)^n$$

donde n es el número de protones transportado para un sustrato de carga eléctrica z (25). Aunque existe un acuerdo general en que muchos sistemas de transporte están impulsados por el $\Delta\tilde{\mu}_H^+$, hay evidencias contrarias a considerar que el gradiente de protones tenga un papel sólo relacionado con el mecanismo de proveer protones para el cotransporte desde el espacio extracelular. Algunos aminoácidos son escasamente transportados en condiciones de anaerobiosis, aunque los valores del ΔpH y del $\Delta\psi$ no están reducidos

significativamente (25). Slavík, J. y Kotyk, A. han sugerido que la actividad de los sistemas de transporte no dependen estrictamente de la diferencia total del gradiente o que están acoplados con el sistema de la H^+ -ATPasa de la cual reciben los protones (113,114). Los autores mencionados han enfatizado la importancia de los gradientes locales de pH en las células, los cuales difieren de los valores determinados, considerando una distribución uniforme de protones dentro de la célula.

A su vez, otros ensayos indicaron que una de las fuentes de energía involucrada en el transporte, está relacionada con la función mitocondrial (25,48).

1.6.2. Papel del potasio en el transporte de aminoácidos

En el estudio del transporte del aminoácido glicina se ha observado una compensación de carga por el ión potasio en forma estequiométrica (49). Resultados similares se obtuvieron en otras levaduras para aminoácidos como L-lisina L-arginina y L-glutamato, en ausencia de funcionamiento de la bomba de protones.

Todos estos datos llevaron a la conclusión que la acumulación de aminoácidos puede estar impulsada por dos gradientes combinados: el de protones en dirección extracelular y el de potasio en la dirección opuesta, a través de la membrana plasmática (25,115,116).

Sin embargo, no existen evidencias de que el movimiento compensatorio tenga lugar en el mismo sistema transportador. La presencia de una bomba de protones en funcionamiento en las células de levadura produce movimientos diferentes para los protones y los iones potasio. En S.carlsbergensis, cuando la glucosa se encuentra presente en el medio, debido a la ausencia de efecto de la glicina sobre el flujo de iones potasio, se ha considerado que los protones cotransportados con el aminoácido son rápidamente elimina-

dos al medio externo por la H^+ -ATPasa. En esas condiciones experimentales, la presencia del ión potasio resulta innecesaria para mantener la electroneutralidad del proceso de transporte (49).

1.6.3. Estimulación del transporte de aminoácidos por consumo de sustratos metabolizables

La actividad de muchos sistemas de transporte, presumiblemente impulsados por el $\Delta\tilde{\mu}_H^+$, es aumentada varias veces cuando células estacionarias son incubadas con sustratos metabolizables como glucosa o etanol (67,117). La estimulación está acompañada por un significativo incremento de la síntesis de proteínas, inhibible por cicloheximida, así como de un aumento de las velocidades máximas sin modificación en los valores de afinidades.

El efecto puede ser suprimido por iodoacetamida, antimicina o por anaerobiosis. Los resultados observados pueden explicarse considerando la síntesis de novo de componentes de los sistemas de transporte o compuestos de alta energía necesarios para la entrada y acumulación del aminoácido (48).

OBJETIVOS

Los procesos de entrada e incorporación de nutrientes en microorganismos eucariotes han sido extensamente estudiados (15,18,25,49). Las investigaciones establecieron la participación de sistemas transportadores o de permeación, así como la especificidad, los requerimientos energéticos y los mecanismos de regulación de los mismos.

Las levaduras, comparten con las bacterias la propiedad de crecer en medios en los cuales la concentración de aminoácidos y otros nutrientes, varía en forma cuali y cuantitativa. En condiciones tan diversas la posibilidad de crecimiento de la célula dependerá, entre otros factores, de su capacidad para modificar la actividad de los sistemas transportadores, de acuerdo a la disponibilidad de nutrientes y los requerimientos metabólicos celulares (15,18).

En levaduras Saccharomyces cerevisiae, para el transporte de L-leucina se han caracterizado cinéticamente dos sistemas, S_1 y S_2 (66,67) y un sistema general, GAP, cuya actividad es regulada por la fuente de nitrógeno del medio de cultivo (15).

La existencia de más de un sistema de transporte para L-leucina, plantea los siguientes interrogantes:

¿Cuál es la relación entre el sistema general, GAP y los sistemas S_1 y S_2 ?

¿Cuál es la participación relativa de los sistemas en el proceso de entrada del aminoácido en cepas silvestres?

¿Cómo se modifica la actividad de los sistemas de transporte por la fuente de nitrógeno del medio de cultivo?

¿Cuál es la respuesta en la actividad de cada sistema de entrada, a variaciones en la concentración de protones en el medio externo?

En base a estos interrogantes y teniendo en cuenta la disponibilidad de cepas mutantes para el transporte del aminoácido, preparadas por el Dr. N. Kotliar en el laboratorio del Dr. J.R. Mattoon (Biotechnology Center. Dept of Biology. University of Colorado, Colorado Springs, USA), se diseñó el siguiente plan de trabajo experimental:

1. Efecto de la fuente de nitrógeno del medio de cultivo sobre la actividad de los sistemas transportadores.
2. Participación de la permeasa general de aminoácidos en el transporte de L-leucina.
3. Mutaciones que afectan la cinética de transporte de L-leucina.
4. Participación del gradiente de protones en el transporte de L-leucina en cepas deficientes respiratorias.
5. Relación del gradiente de protones con la actividad de los diferentes sistemas de transporte.

MATERIALES Y METODOS

3.1. CEPAS DE LEVADURAS

Las cepas de Saccharomyces cerevisiae que se utilizaron en los experimentos son las presentadas en la siguiente lista:

Cepa	Genotipo
JB65	<u>a/a</u>
JB65 rho ⁻ ₁	<u>a/a</u> rho ⁻
JB65 rho ⁻ ₂	<u>a/a</u> rho ⁻
JB65 rho ⁻ ₃	<u>a/a</u> rho ⁻
MMY2	<u>a</u> , <u>ura3</u>
MMY2/H3	<u>a</u> , <u>ura3</u> , <u>gap1</u>
MMY2/LT1/GAP	<u>a</u> , <u>ura3</u> , <u>lep</u>
MMY2/H3 rho ⁻	<u>a</u> , <u>ura3</u> , <u>gap1</u> rho ⁻
D-28	<u>a</u> , <u>lys2</u> , <u>GAL</u>

Las cepas JB65, MMY2, D-28, JB65 rho⁻₁, JB65 rho⁻₂ y JB65 rho⁻₃, fueron gentilmente provistas por el Dr. J.R. Mattoon, Director del "Biotechnology Center, University of Colorado, Colorado Springs, USA". Las cepas isogénicas MMY2/H3, MMY2/H3/LT1 y MMY2/LT1/GAP, obtenidas a partir de la cepa MMY2, fueron aisladas por el Dr. Natalio Kotliar becario externo del CONICET, en el laboratorio del Dr. Mattoon. Las mutantes JB65 rho⁻₁, JB65 rho⁻₂ y JB65 rho⁻₃ fueron aisladas a partir de la cepa JB65, por el método del bromuro de etidio (BrEt) (118) en el mismo laboratorio. La mutante MMY2/H3 rho⁻ fue obtenida por el método citado, en nuestro laboratorio.

3.2. MEDIOS DE CULTIVO

Para los distintos experimentos, las levaduras crecieron en medios ricos y en medios mínimos suplementados con uracilo (10 mg/l) y L-lisina (40 mg/l) de acuerdo al requerimiento de la cepa y distintas fuentes de nitrógeno:

Medio	Composición por litro
Wickerham (119)	Extracto de malta 3 g, extracto de levadura 3 g, peptona 5 g y glucosa 10 g.
YPD	Extracto de levadura 10 g, peptona 10 g y glucosa 20 g.
YPD 0,3	Extracto de levadura 10 g, peptona 10 g y glucosa 3 g.
YPDA	Igual a YPD más sulfato de adenina 80 mg.
YPG	Extracto de levadura 10 g, peptona 10 g y glicerol 30 ml.
YPDG	Extracto de levadura 10 g, peptona 10 g, glucosa 1 g y glicerol 30 ml.
MYNH ₄ ⁺ (68)	Extracto de levadura 1 g, CaCl ₂ 25 mg, MgSO ₄ ·7 H ₂ O 25 mg, KH ₂ PO ₄ 4,5 g, glucosa 20 g y (NH ₄) ₂ SO ₄ 3 g.
MYPro	L-prolina 1 g como fuente de nitrógeno en lugar de (NH ₄) ₂ SO ₄ .
VJNH ₄ ⁺ (120)	Medio Vavra y Johnson modificado: Biotina 0,4 mg, pantotenato de calcio 10 mg, i-inositol 200 mg, tiamina.HCl 88 mg, piridoxina.HCl 24 mg, nicotinamida 5 mg, ZnSO ₄ ·7 H ₂ O 17,4 mg, CuSO ₄ ·5 H ₂ O 1 mg, FeSO ₄ ·7 H ₂ O, 7,3 mg, MgSO ₄ ·7 H ₂ O 1 g, KH ₂ PO ₄ 4 g, NaH ₂ PO ₄ 12 g, ácido succínico 11,8 g, glucosa 20 g y (NH ₄) ₂ SO ₄ 3 g (pH 4,5).
VJPro	L-prolina 1 g como fuente de nitrógeno en lugar de (NH ₄) ₂ SO ₄ (pH 4,5).
VJLeu	L-leucina 1,3 g como fuente de nitrógeno en lugar de (NH ₄) ₂ SO ₄ (pH 4,5).

3.3. MANTENIMIENTO DE LAS CEPAS

Las cepas fueron mantenidas por repiques periódicos, en medio de cultivo sólido Wickerham o YPDA, agar 3%, en tubos con tapa a rosca. Luego de crecer las levaduras a 30°C, los tubos se conservaron a 4°C.

3.4. CURVAS DE CRECIMIENTO

El conocimiento de la curva de crecimiento es importante para los estudios experimentales, puesto que las condiciones fisiológicas celulares, en un medio de cultivo adecuado, varían en las diferentes etapas de crecimiento.

Las células de levadura se propagan por gemación. Un cultivo de levaduras exhibe una curva de crecimiento que se caracteriza por la existencia de por lo menos tres fases: fase inicial o de inducción (fase lag), fase exponencial de crecimiento o de división celular a velocidad constante (fase log) y una fase terminal estacionaria.

En el presente trabajo, el crecimiento celular se siguió por la medida de los valores de la turbidez de suspensiones de levaduras a 540 nm.

En el caso de un cultivo de levaduras, el tiempo de generación para todas las células de cultivo es casi constante y se denomina "tiempo de generación medio" (G). La constante G se determinó siguiendo el crecimiento celular a 540 nm, en función del tiempo y calculando el tiempo transcurrido para que el valor de absorbancia duplique el valor inicial.

El valor de G se calculó de acuerdo a:

$$\frac{dN}{dt} = \mu N \quad \text{integrando}$$

$$\ln \frac{N}{N_0} = \mu t \quad \text{para } N = 2 N_0$$

$$\ln 2 = \mu G$$

$$\frac{0,693}{\mu} = G$$

donde N = número de células a tiempo t.

N_0 = número inicial de las mismas.

μ = constante específica de crecimiento.

G = tiempo de generación.

Se prepararon inóculos de suspensión de cada cepa de levadura, transfiriendo alrededor de 3 mg de peso seco de células (p.s.cél) en un tubo de ensayo, conteniendo 10 ml de agua estéril. Las células se resuspendieron cuidadosamente y la densidad óptica se determinó a 540 nm.

Conocida la densidad óptica se calculó el volumen de inóculo necesario para sembrar el medio líquido, de acuerdo a:

$$V_i = V_t \cdot \frac{D_t}{D_i}$$

donde V_t = volumen del medio de cultivo.

D_t = densidad óptica final que se desea obtener.

D_i = densidad óptica del inóculo.

V_i = volumen del inóculo.

En las curvas realizadas los valores de D_t , oscilaron entre 0,005 y 0,015. Los medios de cultivo sembrados, contenidos en erlenmeyers, en un volumen no mayor del 20% del mismo, crecieron con agitación constante a 30°C. La densidad óptica del medio de cultivo en crecimiento, se siguió a través de alícuotas tomadas a diferentes intervalos de tiempo. Las lecturas obtenidas permitieron calcular los valores de G y el tiempo necesario, para alcanzar cada fase de la curva de crecimiento de la cepa en el medio de cultivo elegido. Los valores obtenidos para las cepas sil-

vestres y mutantes isogénicas fueron:

Cepa	Medio	G (min)	Fase logarítmica tardía (h)
JB65	Wickerham	180	18
MMY2	"	160	16
JB65 rho ⁻ ₁		180	16
JB65 rho ⁻ ₂		225	19
JB65 rho ⁻ ₃		230	20
JB65	VJNH ₄ ⁺	250	28
MMY2	"	195	18
MMY2/H3	"	220	18
MMY2/H3/LT1	"	238	17
JB65	VJPro	350	33
MMY2	"	386	28
MMY2/H3	"	377	28
MMY2/H3/LT1	"	372	32
MMY2	VJLeu	317	30
MMY2/H3	"	362	32
MMY2/LT1/GAP	"	382	32

3.5. CONDICIONES DE CRECIMIENTO

La agitación y la aereación son dos variables importantes que determinan la eficiencia del crecimiento de un microorganismo. Para los cultivos, se utilizaron erlenmeyers conteniendo el respectivo medio líquido, en un agitador New Brunswick modelo G-10 (New Brunswick Scientific Co. Inc, N.Y. USA), operando a 200-250 rpm, 30°C. El inóculo sembrado, preparado con células crecidas en el mismo medio sólido

se dejó desarrollar hasta alcanzar el final de la fase logarítmica de crecimiento.

Las células fueron cosechadas por centrifugación a 2000 rpm, 10 min, en centrífuga refrigerada International, modelo PR-2 (International Equipment Company, Mass. USA) y lavadas dos veces con agua destilada. El sedimento se resuspendió en 100-120 ml de agua destilada y las células se ayunaron durante la noche en condiciones de aereación constante. La suspensión fue centrifugada nuevamente a 2000 rpm 10 min, a 4°C y las células se lavaron dos veces con agua destilada. El sedimento obtenido constituye las denominadas "células ayunadas".

En los medios en que se utiliza el amonio como fuente de nitrógeno, las células se ayunaron con solución de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 20 mM.

3.6. OBTENCION DE MUTANTES DEFICIENTES RESPIRATORIAS, rho⁻

Aproximadamente 2 mg p.s.cél provenientes de medio sólido YPDA, se agregaron en 5 ml de medio YPD. Las células crecieron durante 17 hsa 30°C. 0,2 ml del cultivo obtenido se utilizó para sembrar erlenmeyers conteniendo 15 ml de medio YPD o YPD y BrEt en concentraciones de 50, 75 y 100 µg/ml. Las células crecieron con agitación constante durante 21 hsa 30°C. En el medio sin BrEt se alcanzó un rendimiento de $3,5 \times 10^8$ células/ml. Con la mayor concentración de BrEt el rendimiento fue de $1,7 \times 10^8$ células/ml. A partir de la suspensión celular de cada erlenmeyer se hicieron dos diluciones de 0,1 ml en 10 ml de agua estéril y una tercera dilución en 10 ml, de manera de obtener una concentración final del orden de 7×10^2 células/ml. 0,2 ml de esta suspensión fueron dispersados en placa de Petri conteniendo medio sólido YPD, YPG o medio sólido diferencial YPDG. Las placas se mantuvieron a 30°C.

Luego de 72 hs de crecimiento se observaron colonias, en el medio YPD, de 2,0-2,5 mm de diámetro y de 0,8-1,0 mm de diámetro en el medio diferencial. No se observó en cambio, crecimiento en las placas conteniendo medio YPG. Las colonias del medio YPD correspondieron a deficientes respiratorias ρho^- . Las mutantes aisladas se pasaron a tubos conteniendo medio sólido YPDA.

Como control de la mutación obtenida se determinó el consumo de oxígeno, como se describe en el punto 3.16. En las cepas parentales se encontró una estimulación en el consumo de oxígeno por agregado de glucosa o etanol. En las mismas condiciones en cambio, las cepas mutantes aisladas no consumieron oxígeno.

3.7. AISLAMIENTO DE MITOCONDRIAS

El aislamiento de mitocondrias se hizo a partir de protoplastos de levaduras. Para una eficiente preparación se debe tener en cuenta que las células deben ser cultivadas en condiciones en que no haya represión catabólica por altas concentraciones de glucosa en el medio. Como fuente de carbono puede usarse lactato 2% o glucosa 0,3%. Los métodos para la preparación de protoplastos deben ser eficientes. Después de 60 min de incubación con enzimas líticas, deben encontrarse presentes el 100% de protoplastos, sin evidencia de lisis en sorbitol 1 M.

Preparación de protoplastos

Se inoculó 1 l de medio (extracto de levadura 1%, peptona 1% y glucosa 0,3%) con 0,4 ml de un precultivo de 24 hs de crecimiento en medio YPD, contenido en un tubo de ensayo. Las células crecieron con agitación constante, durante 24 hs a 30°C y se cosecharon por centrifugación a

2000g, 10 min. Un gramo p.s.cél se resuspendió en 20 ml de TrisHCl 100 mM, pH 9,3 conteniendo 1% de 2-mercaptoetanol (amortiguador A) e incubó durante 30 min con agitación ocasional a 30°C. Finalizada la preincubación las células se centrifugaron y lavaron con sorbitol 1 M, y resuspendieron en 10 ml de sorbitol 1 M, conteniendo 0,3-0,4 g de helicasa. La mezcla se incubó a 30°C y a diferentes intervalos de tiempo (0, 20, 40 y 60 min) alícuotas de 20 µl se diluyeron en 2 ml de agua o en sorbitol 1 M. El rendimiento de la formación de protoplastos se siguió contando las células y protoplastos de cada dilución.

Cuando el 90% de células fueron convertidas en protoplastos, usualmente entre 40 y 50 min, se centrifugaron a 2500g, 10 min en centrífuga Sorvall modelo RC-2B y el precipitado se lavó tres veces con sorbitol 1 M.

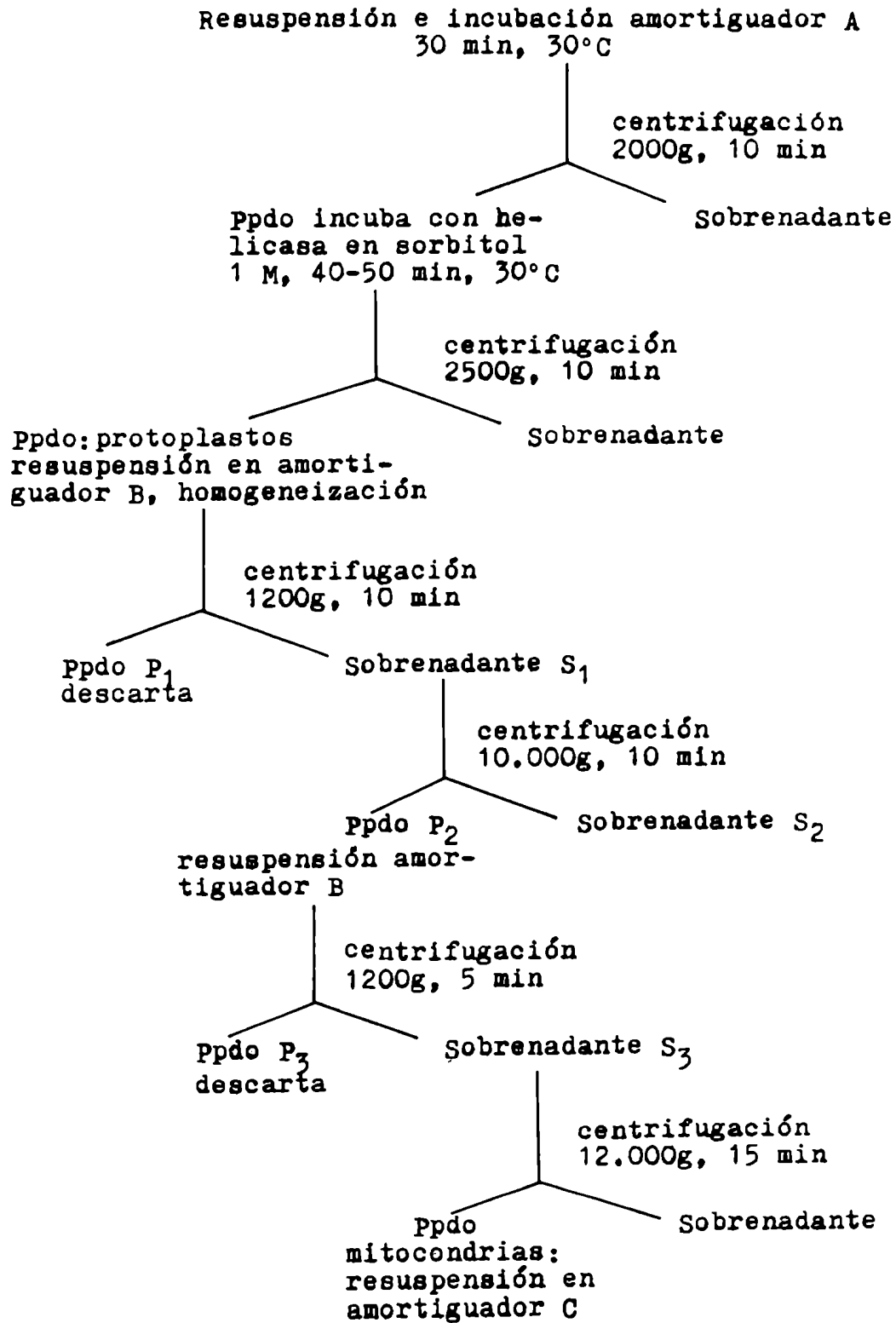
Mitocondrias

Los protoplastos obtenidos fueron resuspendidos en 10 ml de manitol 0,6 M, ácido etilendiaminotetracético (EDTA) 5 mM, albúmina sérica bovina 0,3% (amortiguador B).

La suspensión se volcó en un homogeneizador tipo Waring Blendor y se operó a intervalos de 10 s. La ruptura celular se siguió en un microscopio, alcanzándose una eficiencia del 50%. El homogenato se centrifugó a 1200g, 10 min. El sobrenadante obtenido se pasó a otro tubo y centrifugó a 10.000g, 10 min. El precipitado se transfirió con ayuda de 0,3 ml del amortiguador B en un homogeneizador tipo Potter, teflón-vidrio. Se resuspendió por agregado de 4 ml de amortiguador B. La suspensión se volcó en un tubo de ensayo, centrifugándose a 1200g, 5 min. Se descartó el precipitado y el sobrenadante fue centrifugado a 12.000g, 15 min. El precipitado de mitocondrias se resuspendió en manitol 0,6 M, EDTA 0,02 M (amortiguador C), para obtener una suspensión de 40 mg de proteína/ml. Como control de la calidad de las

Aislamiento de mitocondrias

Células enteras provenientes de cultivo en YP-glucosa 0,3%.



mitocondrias obtenidas, se midió la capacidad de las mismas para consumir oxígeno. La determinación se realizó en una cámara polarográfica conteniendo una solución de manitol 0,6 M, KCl 20 mM, K_2HPO_4 10 mM, Tris maleato 10 mM, pH 6,4 y mitocondrias 3 mg/ml a la que se agregó un sustrato como α -cetoglutarato o citrato y ADP. La respiración resultó estimulada por ADP y disminuyó cuando el mismo se consumió. El contenido en proteínas se determinó por el método de Lowry (121) utilizando albúmina bovina como estándar.

3.8. SUSPENSION CELULAR DE TRABAJO

La concentración celular se estimó diluyendo en agua, una alícuota de la suspensión de levaduras (1:100). La suspensión obtenida se leyó por turbidimetría en un fotocolorímetro Crudo Caamaño (Laboratorio Crudo Caamaño, Buenos Aires, Argentina) a 540 nm. La lectura de densidad óptica obtenida se interpoló en una curva estándar trazada con concentraciones conocidas de la suspensión celular. El valor de la concentración así establecido se consideró aproximado y permitió obtener, en los experimentos, la concentración celular deseada. Al término de cada experimento se constató la misma mediante el método de pesada de una alícuota de trabajo, secada en estufa durante 24 hs a 104°C.

3.9. ENSAYOS DE INCORPORACION DE L-¹⁴C LEUCINA Y L-¹⁴C CITRULINA.

Un ml de suspensión celular conteniendo 5 mg p.s.cél/ml en ftalato ácido de potasio (PHK) 20 mM, pH 4,5 se incubó

con el L-¹⁴C aminoácido, concentración externa 0,05 mM ó 1,0 mM. En los tiempos indicados se tomaron alícuotas de 200 µl de la mezcla de reacción que se filtraron inmediatamente a través de filtros Fisherbrand G4.

Las membranas se lavaron tres veces con 2,0 ml de PHK 20 mM frío. La toma de la muestra, filtración y lavado no requirió mas de 10 s.

Todos los experimentos se llevaron a cabo a 30°C, en un baño con agitación New Brunswick modelo G-76.

3.10. ENSAYOS DE COMPETENCIA

Los ensayos de competencia de la entrada de L-¹⁴C leucina por otros aminoácidos en el medio de reacción, se realizaron con concentraciones externas del L-aminoácido competidor, diez veces mayor que la del aminoácido radiactivo, agregado a T₀.

3.11. CINÉTICA DE ENTRADA DE L-¹⁴C LEUCINA

Para la determinación de las velocidades de entrada de L-leucina se tomaron muestras inmediatamente después de agregada la L-¹⁴C leucina y hasta 3 min después, calculándose las velocidades para concentraciones externas del aminoácido entre 0,02 y 3,0 mM.

3.12. DETERMINACION DEL PH INTERNO

El método utilizado se basa en la medición de la distribución intra-extracelular de un ácido débil como el ácido benzoico (122-124).

Las medidas se realizaron en condiciones similares a las descritas para el estudio de la entrada de L-¹⁴C leucina, reemplazando el L-aminoácido por el ácido ¹⁴C-carboxibenzoico, 50 μM concentración final.

A partir de la radiactividad retenida en la membrana filtrante y el volumen de agua intracelular, se calculó la concentración intracelular del ácido (Ci).

La concentración externa del ácido (Ce), se calculó restando los μmoles retenidos en el filtro y se consideró el volumen extracelular igual al volumen de muestra.

La concentración intracelular $[H^+]_i$, se calculó mediante la siguiente ecuación:

$$[H^+]_i = \frac{Ci}{Ce} \left[\left(\frac{1}{[H^+]_e} + \frac{1}{K_d} \right) - \frac{1}{K_d} \right]^{-1}$$

donde $[H^+]_e$ es la concentración extracelular de protones determinada por la solución amortiguadora del medio y K_d es la constante de disociación del ácido benzoico ($6,31 \times 10^{-5}$). El gradiente de concentración de protones, ΔpH, se calculó de acuerdo a:

$$\Delta pH = pH_i - pH_e$$

donde pH_e corresponde al valor del pH de la solución amortiguadora.

3.13. DETERMINACION DEL VOLUMEN DE AGUA INTRACELULAR

La determinación se realizó por el método descrito por Rottenberg, H. (122) modificado (124).

Una suspensión celular de 25-30 mg/ml p.s.cél se incubó durante 15 min, a 30°C con glucosa 5 mM en amortiguador FHK

20 mM, pH 4,5. 500 μ l de la suspensión se diluyeron (1:1) en el mismo amortiguador y se incubaron con 1 μ l de ^{14}C -metoxi-inulina (0,25 mCi/ml) y 10 μ l de ^3H - H_2O (2 mCi/ml) durante 10 min a 30°C. Después de la incubación se tomaron alícuotas de 400 μ l y se centrifugaron aproximadamente a 10.000g, 1 min en centrífuga Eppendorf, modelo 5414.

El sedimento y el sobrenadante se separaron cuantitativamente, 20 μ l de este último y el sedimento en su totalidad se trataron separadamente con 1 ml de dodecil sulfato de sodio 1% durante 12 hs.

Al término del tratamiento, se determinó el contenido de ^3H y ^{14}C en alícuotas de 400 μ l, por centelleo líquido con solución centelladora de Bray (125).

El volumen de agua intracelular se calculó según:

$$V_i = V_m \left(\frac{{}^3\text{H}_p}{{}^3\text{H}_s} - \frac{{}^{14}\text{C}_p}{{}^{14}\text{C}_s} \right)$$

donde V_i = volumen de agua intracelular

V_m = volumen de muestra empleada

Los subíndices s y p indican los contenidos de ^3H y ^{14}C en el sobrenadante y precipitado respectivamente. En las cepas usadas se obtuvo un valor de 2 μ l/mg p.s.cél.

3.14. MEDIDA DE LA SALIDA DE PROTONES

Para la determinación se suspendieron en un recipiente termostatzado a 30°C, 5 ml de células en concentración aproximada 6 mg p.s.cél/ml en amortiguador FHK 4 mM o 20 mM.

La modificación del pH externo (pHe) se siguió en un pHmetro Corning modelo 130. La salida de protones, con con-

sumo simultáneo de sustrato, se realizó agregando glucosa a tiempo 0; 5 mM concentración final. Los nmoles liberados al medio se estiman a partir de una calibración previa con pulsos de HCl.

3.15. DETERMINACION DE LA RADIATIVIDAD DE LAS MUESTRAS

La actividad total de ^{14}C de las muestras retenidas en las membranas filtrantes, fue determinada en un contador de centelleo líquido Tracor Analytic Delta 300 (Tracor Analytic, Illinois, USA).

Las membranas se colocaron en viales con una mezcla centelladora compuesta por 2,5-difeniloxazol (PPO) 2,5 g, 1,4-bis 5-fenil-2-oxazolil benceno (POPOP) 50 mg por litro de tolueno.

En la determinación de agua intracelular, la actividad de las muestras acuosas se determinó por el método de Bray (125), la mezcla contiene PPO 4 g, POPOP 200 mg, etilenglicol 20 ml, metanol 100 ml, naftaleno 60 g y dioxano hasta 1 l.

3.16. MEDIDA DEL CONSUMO DE OXIGENO

Para las determinaciones del consumo de oxígeno se empleó un oxígrafo de Gilson Medical Electronics (Middletown, Wisconsin, USA) modelo K, en cuya celda se colocaron 2,0 ml de suspensión de levaduras en condiciones análogas a las empleadas en los ensayos de incorporación de $\text{L-}^{14}\text{C}$ leucina (concentración, pH, temperatura, agitación). En el caso de los controles para las mitocondrias se utilizaron los amortiguadores y sustratos que se describen en el aislamiento de las mismas.

3.17. DISEÑO EXPERIMENTAL

En todos los casos T_0 es el tiempo de adición de $L^{14}C$ leucina a la suspensión de células en agitación, en el baño de incubación a $30^\circ C$. Las muestras que se toman inmediatamente después de T_0 se denominan muestras a T_0 . Estos valores representan los valores de unión del aminoácido a la barrera de permeabilidad.

Las muestras T_{0+t} se consideran la expresión de otros procesos. Si t es mayor que 3 min, los valores son los de incorporación total del aminoácido y son el resultado de la entrada, acumulación y salida del mismo en las células. Cuando t es menor o igual a 3 min, T_{0+t} corresponde a la entrada, transporte o influjo, ya que en ese intervalo no hay eflujo.

En relación con la condición energética de las células, se ha descrito que después de ser cultivadas se someten a un ayuno, estableciéndose así la condición de "células con baja carga energética" o "células ayunadas".

En algunos ensayos estas células ayunadas se incubaron con sustratos oxidables como glucosa 5 mM, o etanol 10 mM, en solución amortiguadora FHK 20 mM, pH 4,5 en baño termostático, durante 15 min a $30^\circ C$. De esta forma se establece el estado de "alta carga energética" o "células energizadas". En estos casos los sustratos empleados en la energización, se separaron del medio por centrifugación en centrífuga Sorvall modelo RC-2B, a 3000g, 5 min. Los sobrenadantes se descartaron y los sedimentos obtenidos se resuspendieron en agua destilada, utilizándose inmediatamente en los ensayos de incorporación.

En todas las determinaciones la toma de muestra, filtración y lavado de las células requirió 5-10 s. Los experimentos se realizaron por triplicado y los valores presentados son su promedio. La desviación de estos valores con

respecto a la media fue de un 5%.

3.18. ORIGEN Y CALIDAD DE LOS REACTIVOS EMPLEADOS

L-¹⁴C leucina, L-¹⁴C citrulina, ¹⁴C-metoxi-inulina de New England Nuclear, USA.

³H-H₂O y ácido ¹⁴C carboxi-benzoico de C.E.A. France.

Los L-aminoácidos, α-D(+) glucosa, FHK, PPO, vitaminas de Sigma Chemical Company, St.Louis, USA.

Helicasa de Reactifs IBF, Villeneuve La Garenne, France.

POPOP de Nuclear Chicago, Mass. USA.

Extracto de malta, extracto de levadura, peptona y agar de Difco.

Todos los demás reactivos fueron de grado analítico.

RESULTADOS

4. SISTEMAS TRANSPORTADORES DE L-LEUCINA EN S.CEREVISIAE CEPA JB65

4.1. INCORPORACION Y ENTRADA DE L-¹⁴C LEUCINA

Los valores de incorporación y de entrada de L-leucina, para la cepa JB65 silvestre diploide, se determinaron en levaduras crecidas en distintos medios de cultivo. Se utilizó un medio rico como el medio Wickerham y medios mínimos conteniendo iones amonio o el aminoácido L-prolina como fuente de nitrógeno.

En las figuras 4.1.a y 4.1.b, se observan los datos de la incorporación de L-¹⁴C leucina en células crecidas en los medios MYNH₄⁺, MYPro o Wickerham y luego energizadas por incubación con glucosa 5 mM, 15 min a 30°C. Con la concentración externa de L-leucina 0,05 mM, los valores de la incorporación son similares en células crecidas en MYNH₄⁺ o en Wickerham y menores que en MYPro.

El aumento de la incorporación por efecto de L-prolina se observa en los valores de entrada y es mayor para la concentración de L-leucina más baja, 3,5 veces y 1,8 veces para L-leucina 1,0 mM. En el primer caso, el proceso es concentrativo, tanto en células crecidas en presencia de amonio, Ci/Ce = 2, como de L-prolina, Ci/Ce = 6, mientras que no es concentrativo con la mayor concentración externa de L-leucina.

Cuando la levadura se cultiva en un medio mínimo de vitaminas y minerales suplementado con amonio (VJNH₄⁺) o con L-prolina (VJPro), los valores de incorporación de L-¹⁴C leucina medidos hasta 10 min, son los presentados en la figura 4.2.

Para la concentración externa 0,05 mM, figura 4.2.a., la incorporación de L-leucina en células crecidas en VJNH₄⁺ es lineal hasta los 10 min y la entrada es concentrativa, Ci/Ce = 10. En el caso de las células crecidas en VJPro, la

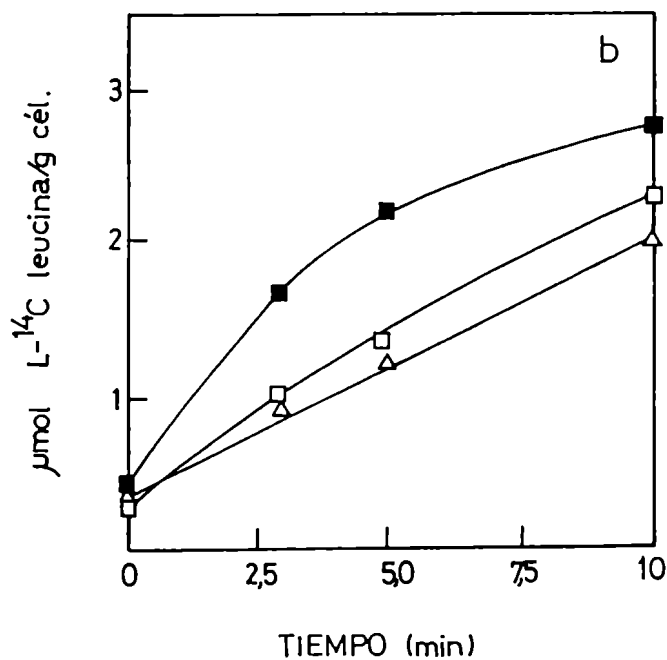
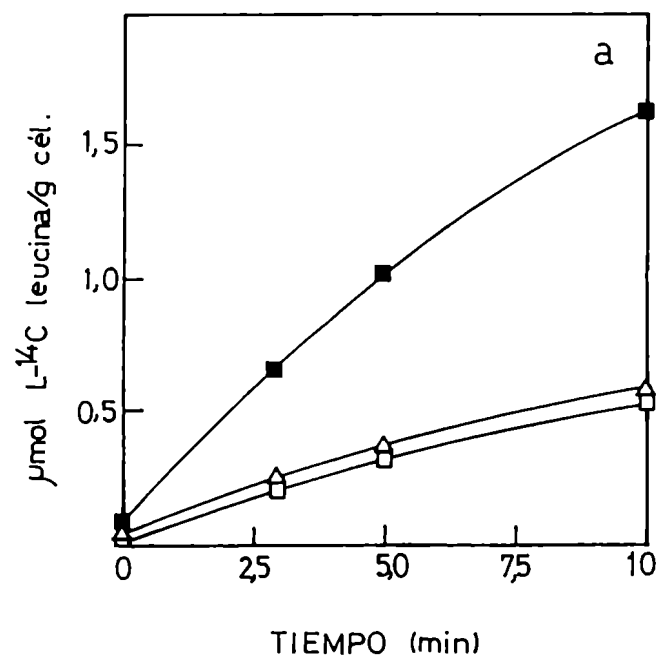


Figura 4.1.: Incorporación de L-leucina en la cepa JB65 crecida en medio wickerham (Δ) MYNH₄⁺ (\square) ó MYPro (\blacksquare). Células energizadas por preincubación con D-glucosa. L-¹⁴C leucina externa; 0,05 mM (a); 1,0 mM (b). A los tiempos indicados se tomaron alícuotas que se procesaron para la determinación de la radiactividad intracelular.

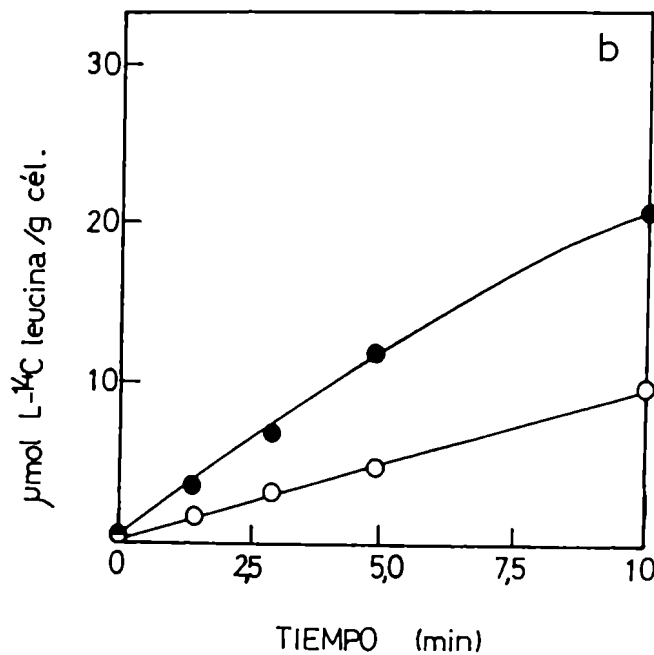
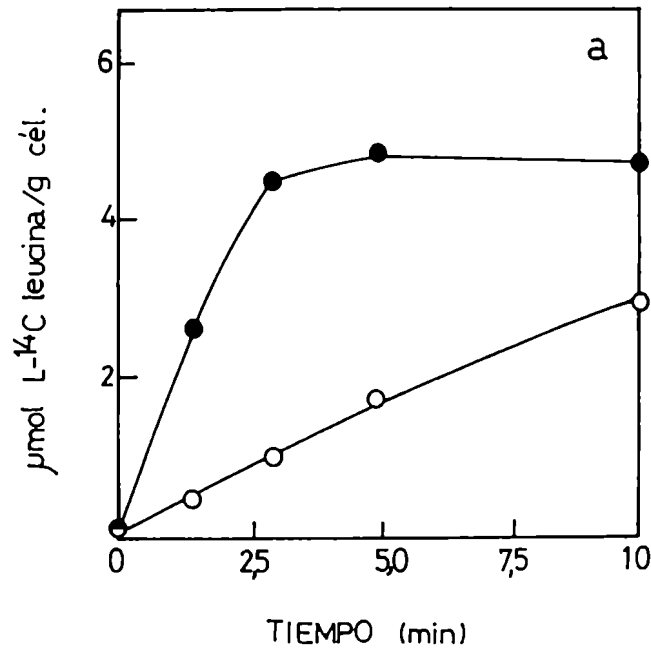


Figura 4.2.: Incorporación de L-leucina en la cepa JB65 crecida en medio VJNH₄⁺ (○) ó VJPro (●). Células energizadas por preincubación con D-glucosa. L-¹⁴C leucina externa: 0,05 mM (a); 1,0 mM (b). A los tiempos indicados se tomaron alícuotas que se procesaron para la determinación de la radiactividad intracelular.

cinética de incorporación muestra una rápida velocidad de entrada, alcanzándose el estado estacionario después de los 3 min. El proceso de entrada, en esas condiciones, es altamente concentrativo, $C_i/C_e = 45$.

Con la concentración externa 1.0 mM de L-leucina, figura 4.2.b. la incorporación en células crecidas con amonio o L-prolina es lineal hasta los 10 min y el proceso de entrada es poco concentrativo ($VJNH_4^+$ $C_i/C_e = 1,5$; $VJPro$ $C_i/C_e = 3,5$).

4.2. PARAMETROS CINETICOS DE LOS SISTEMAS TRANSPORTADORES

Para establecer si los sistemas S_1 y S_2 pueden ser caracterizados en células crecidas en los medios $VJNH_4^+$ o $VJPro$, se midió la velocidad de entrada de L-leucina en esas células. Para las células crecidas en el medio $VJNH_4^+$, en condiciones de represión de la GAP, las representaciones de Lineweaver-Burk y Hofstee, figura 4.3.a. son similares a las de células crecidas en medio Wickerham (76),

En células crecidas en medio $VJPro$, se puede caracterizar un solo sistema, figura 4.3.b.

Por el método de análisis de datos de Lineweaver-Burk se obtuvieron los valores de los parámetros cinéticos presentados en la tabla 4.I. En presencia de amonio en el medio de cultivo, no se observa modificación en la afinidad de los sistemas S_1 y S_2 , pero los valores de velocidad máxima de ambos sistemas, son entre 5-6 veces menores respecto de los valores obtenidos utilizando el medio Wickerham. Por otro lado, el sistema único que opera en células provenientes del medio $VJPro$ tiene afinidad similar al sistema S_1 y velocidad máxima del orden del sistema S_2 .

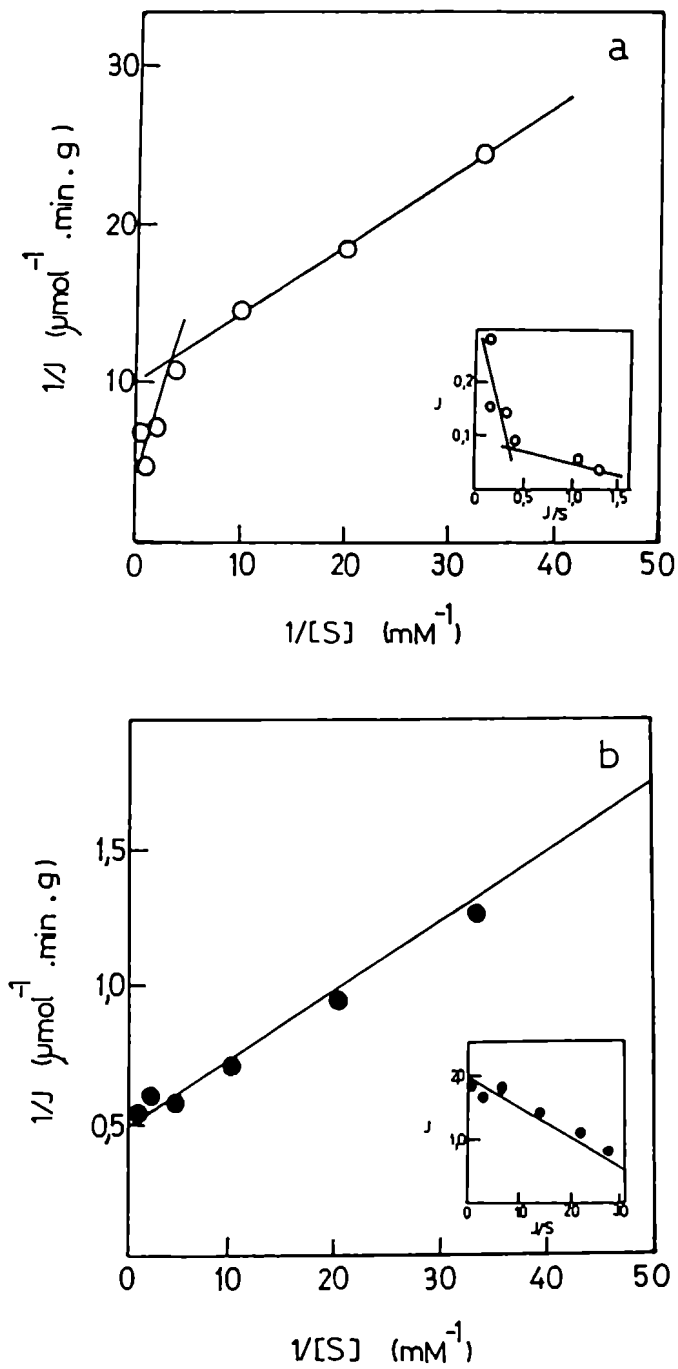


Figura 4.3.: Cinética de entrada de L-leucina en la cepa JB65 crecida en medio VJNH_4^+ (O) ó VJPro (●). Células energizadas por preincubación con D-glucosa. Representaciones de Lineweaver-Burk y Hofstee (inserto).

Tabla 4.I.: Parámetros cinéticos de la entrada de L-leucina en la cepa JB65.

Medio de cultivo	K_T (mM)	J_{max} ($\mu\text{mol}/\text{min}\cdot\text{g}$)
Wickerham	0,034	0,53
	0,410	1,59
VJNH ⁺ ₄	0,044	0,10
	0,457	0,26
VJPro	0,051	2,06

Los valores se calcularon por el método de análisis de datos de Lineweaver-Burk según las representaciones de la figura 4.3. o de (76).

4.3. ENSAYOS DE COMPETENCIA

Con el fin de conocer la participación de los sistemas S_1 y S_2 y de la GAP, en las condiciones experimentales descriptas anteriormente; en células crecidas en medio Wickerham, $VJNH_4^+$ o VJPro, se determinó la entrada de $L-^{14}C$ leucina en presencia de concentraciones externas diez veces mayores de L-leucina o de L-citrulina, un aminoácido que es transportado exclusivamente por la GAP (53).

En la tabla 4.II. se observan los resultados obtenidos. En todos los casos la L-leucina produce una inhibición mayor que la L-citrulina. En células crecidas en medio Wickerham o $VJNH_4^+$, la L-citrulina inhibe la entrada de $L-^{14}C$ leucina con la menor concentración de L-leucina externa, pero no hay inhibición significativa con la mayor concentración externa. En células crecidas con L-prolina, los valores de entrada en presencia de L-citrulina, disminuyen para las dos concentraciones externas. Estos resultados indican que en células crecidas en medio Wickerham o $VJNH_4^+$ hay un bajo funcionamiento de la GAP cuando las concentraciones externas de $L-^{14}C$ leucina son bajas y que no hay entrada del aminoácido mediado por la GAP, a mayores concentraciones externas.

4.4. ENTRADA DE $L-^{14}C$ LEUCINA EN CELULAS PREINCUBADAS CON GLUCOSA E IONES AMONIO.

Para estudiar el efecto inhibitorio del amonio, sobre los distintos sistemas de entrada de L-leucina, se propusieron distintas condiciones experimentales para las medidas del transporte del aminoácido.

Células provenientes del medio de cultivo Wickerham se ayunaron y posteriormente se preincubaron por 2 hs con

Tabla 4.II.: Ensayos de competencia de la entrada de L-leucina.

Medio de cultivo	Adiciones	Entrada de L- ¹⁴ C leucina Inhibición (%)	
		(1)	(2)
Wickerham	L-leucina	67	39
	L-citrulina	32	4
VJNH ₄ ⁺	L-leucina	80	52
	L-citrulina	28	8
VJPro	L-leucina	81	88
	L-citrulina	46	56

Células energizadas por preincubación con D-glucosa.
L-¹⁴C leucina externa: 0,05 mM (1); 1,0 mM (2).

glucosa 50 mM, en presencia o ausencia de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 20 mM, en FHK 20 mM. La mezcla de preincubación se centrifugó y las células se resuspendieron luego en H_2O ó $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 20 mM y alícuotas se agregaron a la mezcla de incubación (1:2) en que se mide la entrada de $\text{L-}^{14}\text{C}$ leucina y el efecto de la L-citrulina como competidor, según se detalló en Materiales y Métodos.

En la tabla 4.III. se observa que en las células preincubadas con glucosa y amonio los valores de entrada son más altos (2 y 1,6 veces) que en células preincubadas con glucosa. En el primer caso la L-citrulina no inhibe la entrada de $\text{L-}^{14}\text{C}$ leucina en las dos concentraciones externas de ésta. En el segundo caso produce una inhibición del 40 por ciento de la entrada de $\text{L-}^{14}\text{C}$ leucina a baja concentración externa y un 22 por ciento para alta concentración externa.

En células preincubadas con glucosa, la presencia del amonio durante el ensayo de entrada produce una inhibición del 36 por ciento respecto del control para la concentración externa 0,05 mM.

Además del efecto producido por el amonio, la L-citrulina inhibe en un 12 por ciento los valores de entrada. Un análisis similar de los resultados para células incubadas con glucosa y amonio, demuestra que el amonio en el medio de incubación, inhibe un 17 por ciento la entrada en las dos concentraciones externas. En ambos casos la L-citrulina no produce inhibición significativa.

Tabla 4.III.: Represión e inhibición por amonio de los sistemas de entrada de L-leucina.

Medio de preincubación	Medio de incubación	Entrada de L- ¹⁴ C leucina (1)	(2)
Glucosa 50 mM	---	0,200	0,732
	L-citrulina	0,120 (40)##	0,572 (22)##
Glucosa 50 mM	NH ₄ ⁺	0,129 (36)#	0,759
	NH ₄ ⁺ L-citrulina	0,113 (12)##	0,745 (1,7)##
Glucosa 50 mM	---	0,406	1,17
NH ₄ ⁺ 40 mM	L-citrulina	0,388 (4,4)##	1,36 (3,0)##
Glucosa 50 mM	NH ₄ ⁺	0,332 (17)#	0,972 (17)#
NH ₄ ⁺ 40 mM	NH ₄ ⁺ L-citrulina	0,300 (9,6)##	0,852 (12)##

Células ayunadas de la cepa JB65 provenientes de medio Wickerham se preincubaron con D-glucosa 50 mM ó D-glucosa 50 mM, NH₄⁺ 40 mM por 2 hs, 30°C en PHK 20 mM, pH 4,5. L-¹⁴C leucina externa: 0,05 mM (1); 1,0 mM (2).

Inhibición por amonio (%); ## inhibición por L-citrulina (%).

5. SISTEMAS TRANSPORTADORES DE L-LEUCINA EN S.CEREVISIAE CEPAS MMY2, MMY2/H3 Y MMY2/LT1/GAP.

5.1. INCORPORACION Y ENTRADA DE L-¹⁴C LEUCINA.

La incorporación y entrada de L-¹⁴C leucina en las cepas se estudió inicialmente en células crecidas en medio rico Wickerham, ayunadas y energizadas por preincubación con glucosa. Según se observa en la figura 5.1., los valores de incorporación y entrada en la cepa MMY2 y su mutante gap, MMY2/H3 son similares tanto a bajas concentraciones, 0,05 mM como con altas concentraciones, 1,0 mM de L-¹⁴C leucina externa. Para estas dos cepas la relación de concentración de L-leucina interna a externa, Ci/Ce, para T₀₊₃min es igual a 20 para la menor concentración e igual a 2,5 para la mayor concentración. Estos resultados concuerdan con los obtenidos para la cepa diploide JB65; e indican que en medios ricos como el Wickerham, el transporte del aminoácido es mediado principalmente por los sistemas S₁ y S₂.

Los valores de entrada de L-¹⁴C leucina en células de la cepa MMY2 crecidas en medio VJNH₄⁺ o VJPro se presentan en la figura 5.2. Las células crecidas en medio VJNH₄⁺ y luego ayunadas no acumulan el aminoácido para las dos concentraciones externas ensayadas, mientras que en células ayunadas provenientes de VJPro, a T₀₊₃min, la relación Ci/Ce es igual a 30 y 2,5 respectivamente. La energización de las células produce un aumento en los valores de entrada del aminoácido. El efecto es significativo en las células provenientes del medio con iones amonio, a baja concentración externa, donde la relación Ci/Ce alcanza un valor igual a 6. Para la misma concentración también se observa saturación a partir de T₀₊₃min cuando el aminoácido L-prolina es la fuente de nitrógeno.

Determinaciones similares se realizaron en la cepa MMY2/H3, mutante gap, figura 5.3. En estas células hay una

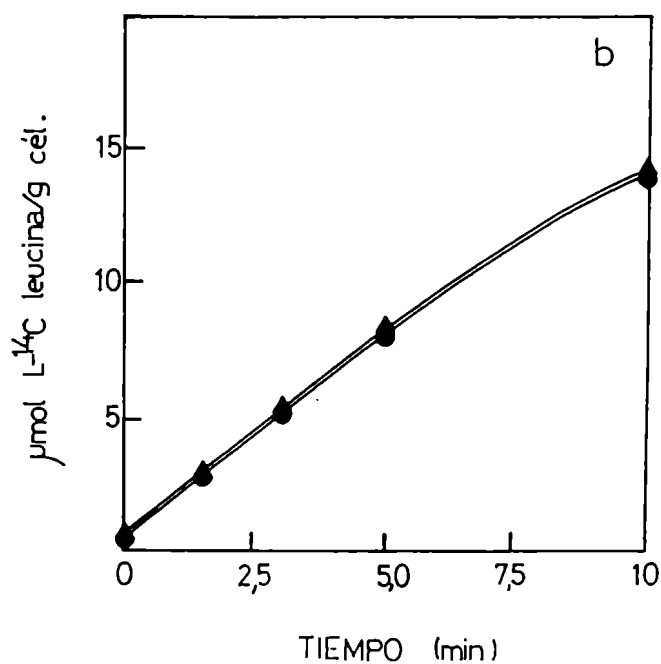
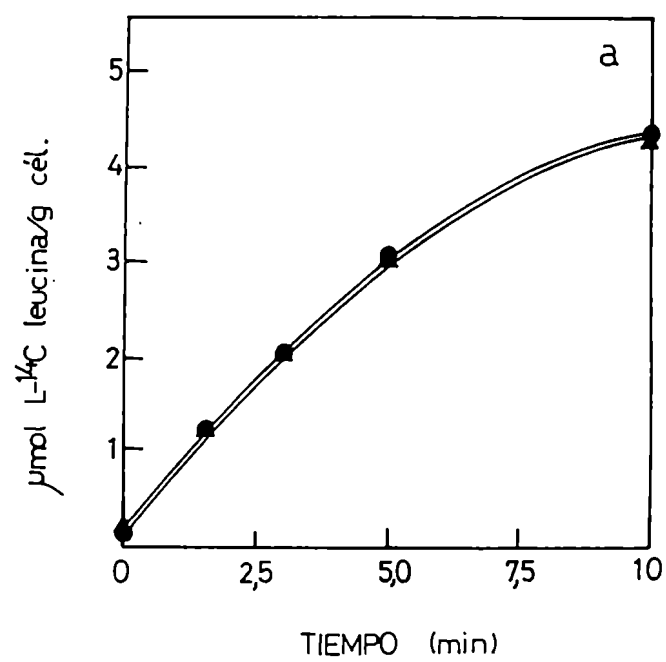


Figura 5.1.: Incorporación de L-leucina en las cepas MMY2 (●) y MMY2/H3 (▲) crecidas en medio Wickerham. Células energizadas por preincubación con D-glucosa. L-¹⁴C leucina externa: 0,05 mM (a); 1,0 mM (b). A los tiempos indicados se tomaron alícuotas que se procesaron para la determinación de la radiactividad intracelular.

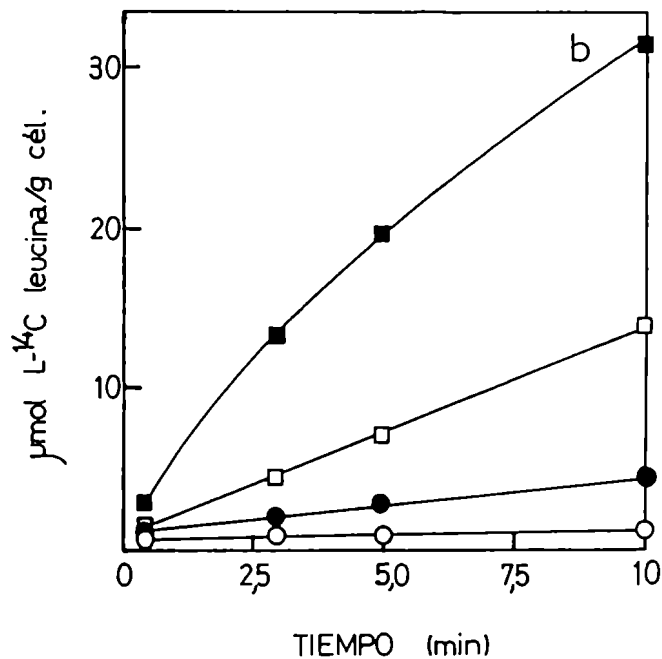
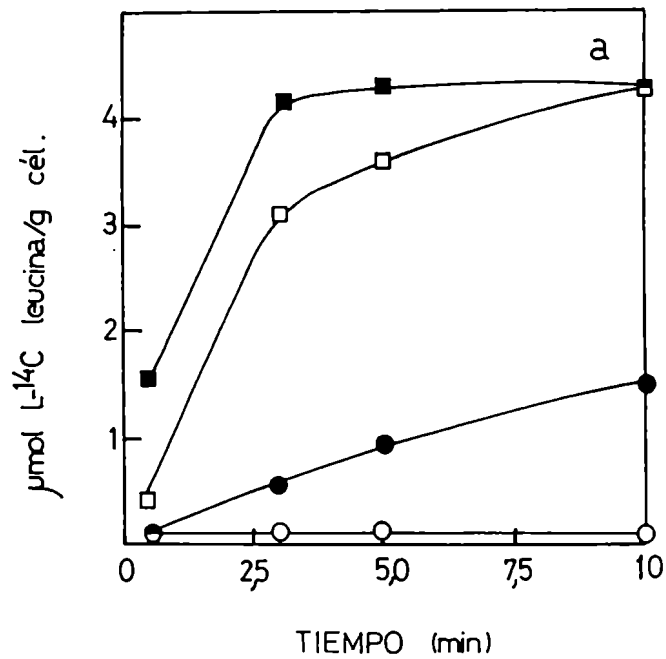


Figura 5.2.: Incorporación de L-leucina en la cepa MMY2 crecida en medio VJNH₄⁺ (O-●) ó VJPro (□-■). Células ayunadas (O-□) ó energizadas por preincubación con D-glucosa (●-■). L-¹⁴C leucina externa: 0,05 mM (a); 1,0 mM (b). A los tiempos indicados se tomaron alícuotas que se procesaron para la determinación de la radiactividad intracelular.

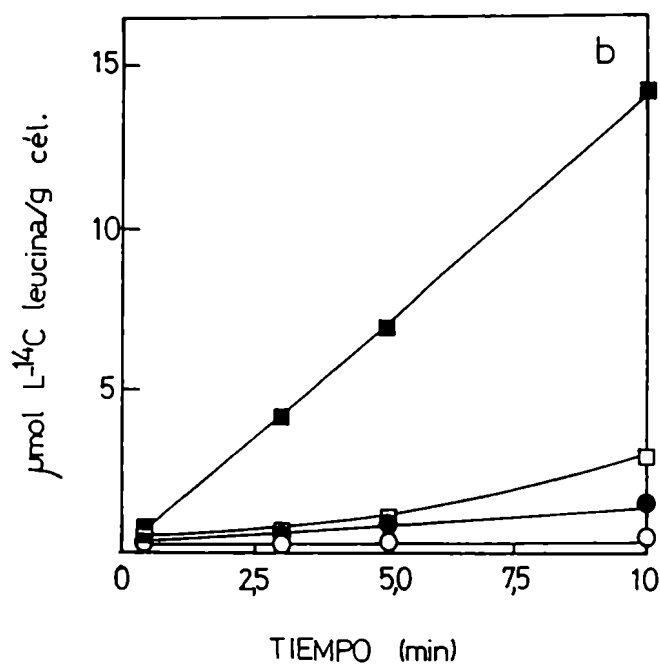
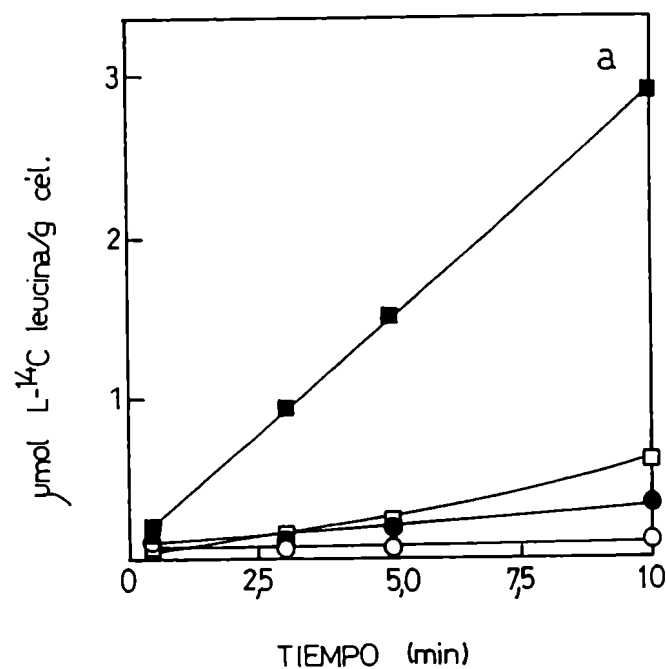


Figura 5.3.: Incorporación de L-leucina en la cepa MMY2/H3 crecida en medio $VJNH_4^+$ (O - ●) ó $VJPro$ (□ - ■). Células ayunadas (O - □) ó energizadas por preincubación con D-glucosa (● - ■). L-¹⁴C leucina externa: 0,05 mM (a); 1,0 mM (b). A los tiempos indicados se tomaron alícuotas que se procesaron para la determinación de la radiactividad intracelular.

mayor incorporación del aminoácido cuando la L-prolina es utilizada como fuente de nitrógeno del medio de cultivo. El incremento no puede asociarse a la actividad de la GAP, debido a la mutación que presenta esta cepa. En las células ayunadas no se observa acumulación a T_{0+3} min, para las dos concentraciones y medios de cultivo ensayados. Por energización de las células del medio $VJNH_4^+$, tampoco se produce acumulación a T_{0+3} min. Para las células crecidas en medio VJPro el valor de C_i/C_e , a ese tiempo, es igual a 10 para la baja concentración y de 2 para la mayor concentración del aminoácido. A diferencia de lo observado con la cepa silvestre, figura 5.2., no se alcanza saturación cuando se utiliza la menor concentración del aminoácido.

5.2. PARAMETROS CINETICOS DE LOS SISTEMAS TRANSPORTADORES

Teniendo en cuenta los sistemas presentes en la cepa silvestre diploide JB65, resultó de interés confirmar esos resultados en la cepa haploide MMY2 y su mutante gap, MMY2/H3.

En la figura 5.4. se muestra la representación de Lineweaver-Burk y Hofstee en células de MMY2 crecidas en $VJNH_4^+$ o VJPro. Para el medio $VJNH_4^+$ pueden caracterizarse cinéticamente dos sistemas para el transporte de L-leucina y un sistema único para el medio VJPro.

En la cepa MMY2/H3 en cambio, figura 5.5., dos sistemas median el transporte, tanto en el medio $VJNH_4^+$ como VJPro.

Para completar el estudio de los sistemas transportadores de L-leucina se investigó su incorporación en la cepa MMY2/LT1/GAP. Esta cepa se aisló a partir de la doble mutante MMY2/H3/LT1 por reversión de la mutación gap presente en esta mutante. En MMY2/LT1/GAP la incorporación de L-leucina es mediada únicamente por la GAP y no por los sistemas S_1 y S_2 . Las determinaciones cinéticas en células cre-

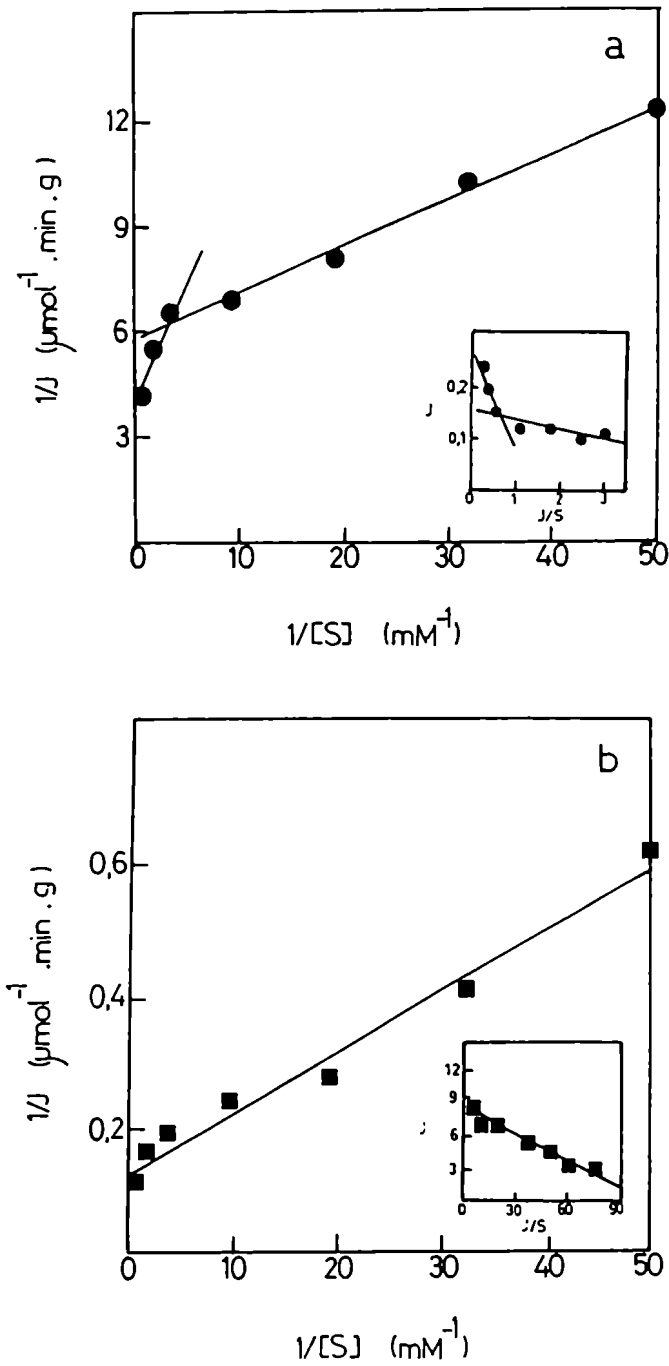


Figura 5.4.: Cinética de entrada de L-leucina en la cepa MMY2 crecida en medio VJNH_4^+ (●) ó VJPro (■). Células energizadas por preincubación con D-glucosa. Representaciones de Lineweaver-Burk y Hofstee (inserto).

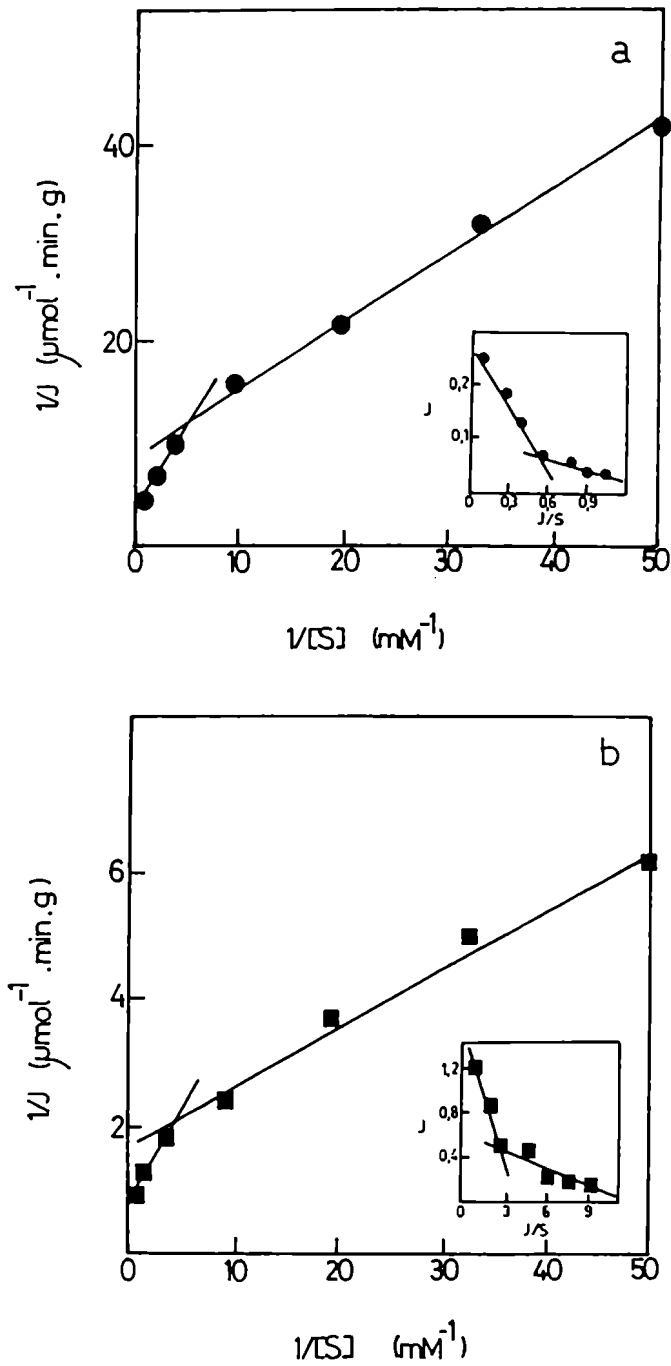


Figura 5.5.: Cinética de entrada de L-leucina en la cepa MMY2/H3 crecida en medio VJNH₄⁺ (●) ó VJPro (■).

Células energizadas por preincubación con D-glucosa. Representaciones de Lineweaver-Burk y Hofstee (inserto).

cidas en medio VJPro, permiten caracterizar un solo sistema para el transporte, figura 5.6.

Los valores de los parámetros cinéticos obtenidos por el método de análisis de datos de Lineweaver-Burk se presentan en la tabla 5.I. Para las cepas MMY2 y MMY2/H3 se observa la operación de dos sistemas con valores de parámetros del mismo orden, cuando el amonio es la fuente de nitrógeno en el medio de cultivo. En la mutante gap en medio VJPro hay dos sistemas de afinidad del orden de la descrita para los sistemas S_1 y S_2 y de mayor J_{max} que la encontrada en el medio $VJNH_4^+$. Estos valores indican que los sistemas S_1 y S_2 son parcialmente sensibles en la mutante gap a la presencia de iones amonio en el medio de cultivo. En la cepa silvestre en cambio, el único sistema tiene alta afinidad y alta J_{max} . En MMY2/LT1/GAP debido a la deficiencia en los sistemas S_1 y S_2 , los parámetros cinéticos corresponden a la actividad de la GAP para el transporte de L-leucina. Sus valores son del mismo orden que los obtenidos para el transporte de otros aminoácidos por el sistema general (53).

5.3. INCORPORACION Y ENTRADA DE L- ^{14}C LEUCINA EN CELULAS CRECIDAS EN MEDIO CON L-LEUCINA COMO FUENTE DE NITROGENO.

En células de S.cerevisiae se ha descrito que la entrada de L-leucina resulta aumentada cuando el aminoácido es utilizado como fuente de nitrógeno del medio de cultivo (5).

En la figura 5.7. se grafica la cinética de incorporación de L-leucina, en células ayunadas y en células energizadas de la cepa MMY2 crecidas en medio VJLeu.

A T_{0+3min} la relación C_i/C_e es igual a 30 tanto en células ayunadas como energizadas, para la menor concentración

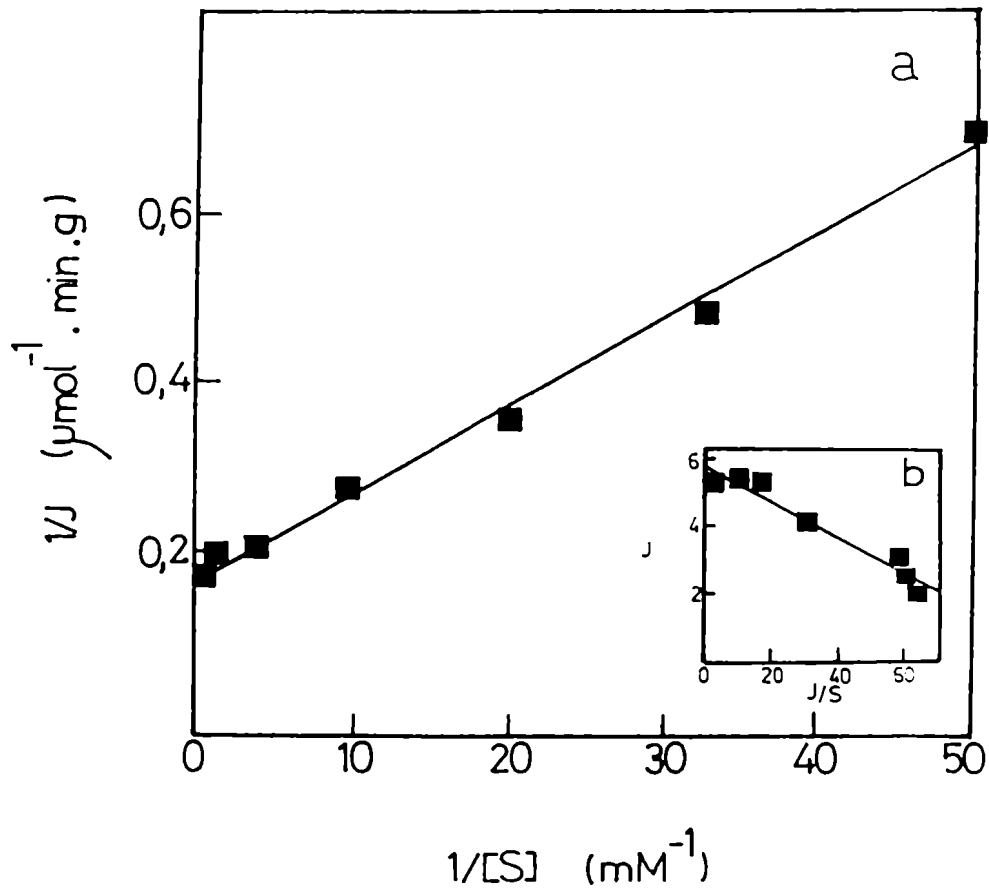


Figura 5.6.: Cinética de entrada de L-leucina en la cepa MMY2/LT1/GAP crecida en medio VJPro. Células energizadas por preincubación con D-glucosa. Representaciones de Lineweaver-Burk y Hofstee (inserto).

Tabla 5.1.: Parámetros cinéticos de las cepas MMY2, MMY2/H3 y MMY2/LT1/GAP.

Cepa	Medio de cultivo	K_T (mM)	J_{max} ($\mu\text{mol/g}\cdot\text{min}$)
MMY2	VJNH ₄ ⁺	S ₁	0,17
		S ₂	0,24
	VJPro	S	8,39
MMY2/H3	VJNH ₄ ⁺	S ₁	0,11
		S ₂	0,29
	VJPro	S ₁ S ₂	0,64 1,34
MMY2/LT1/GAP	VJPro	S	5,58

Los valores se calcularon por el método de análisis de datos de Lineweaver-Burk según las representaciones de las figuras 5.4.-5.6.

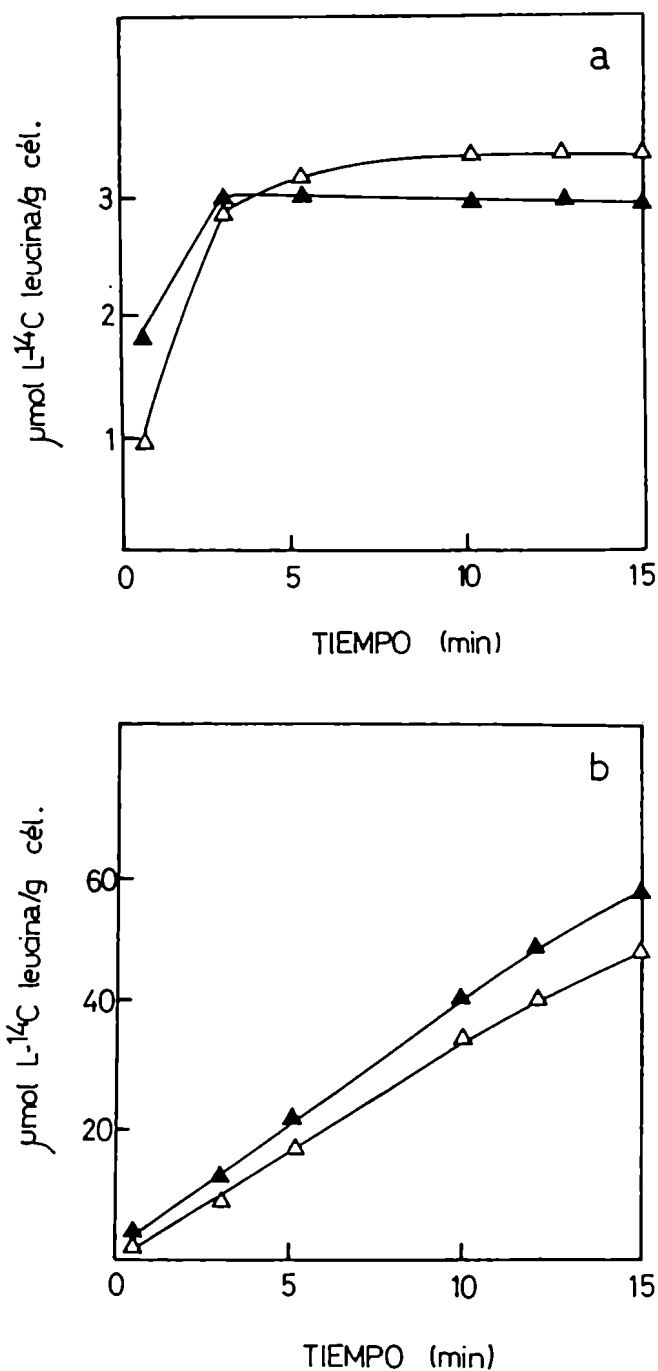


Figura 5.7.: Incorporación de L-leucina en la cepa MMY2 crecida en medio VJLeu.

Células ayunadas (Δ) ó energizadas por preincubación con D-glucosa (▲). L-¹⁴C leucina externa: 0,05 mM (a); 1,0 mM (b). A los tiempos indicados se tomaron alícuotas que se procesaron para la determinación de la radiactividad intracelular.

del aminoácido se observa además, una rápida entrada y saturación a partir de T_{0+3} min.

Para discriminar si esta mayor entrada se debe a un aumento en la actividad de los sistemas S_1 y S_2 o de la GAP, se midió en forma similar la entrada de $L-^{14}C$ citrulina, figura 5.8. Los resultados obtenidos con las dos concentraciones externas de L-citrulina son similares a los determinados en células crecidas en el medio VJPro, en el que se describió la desrepresión de la GAP.

En el caso de células de MMY2/H3 crecidas en VJLeu y energizadas, figura 5.9. el proceso de entrada no alcanza la saturación con la menor concentración de $L-^{14}C$ leucina a diferencia de lo encontrado en la cepa silvestre. A T_{0+3} min la relación C_i/C_e del aminoácido es de 10, concentración externa menor de L-leucina y de 3 para la concentración externa mayor. En iguales condiciones las células ayunadas no acumulan el aminoácido.

Las cinéticas de entrada en células energizadas permiten caracterizar, un solo sistema en la cepa silvestre, figura 5.10. y dos sistemas en la mutante gap, figura 5.11. Los parámetros cinéticos de la entrada de L-leucina calculados por el método de Lineweaver-Burk se presentan en la tabla 5.II.

Las constantes cinéticas corresponden a la operación de un solo sistema en la cepa silvestre MMY2 de alta afinidad y alta J_{max} y dos sistemas en la mutante MMY2/H3 uno de alta afinidad y baja J_{max} y el otro de baja afinidad y alta J_{max} . Los valores de las constante K_T y J_{max} son del orden de los ya descritos para células crecidas en medio VJPro, tabla 5.I.

5.4. ENSAYOS DE COMPETENCIA

Los ensayos de competencia por los sistemas de entrada

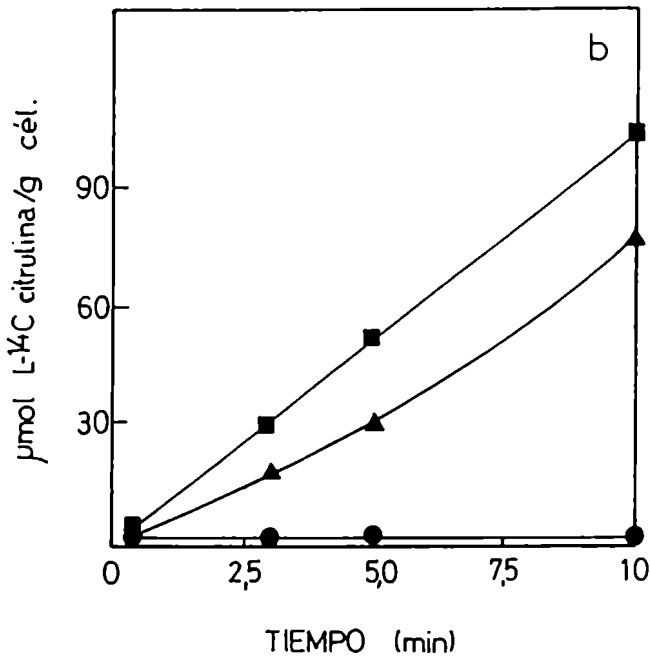
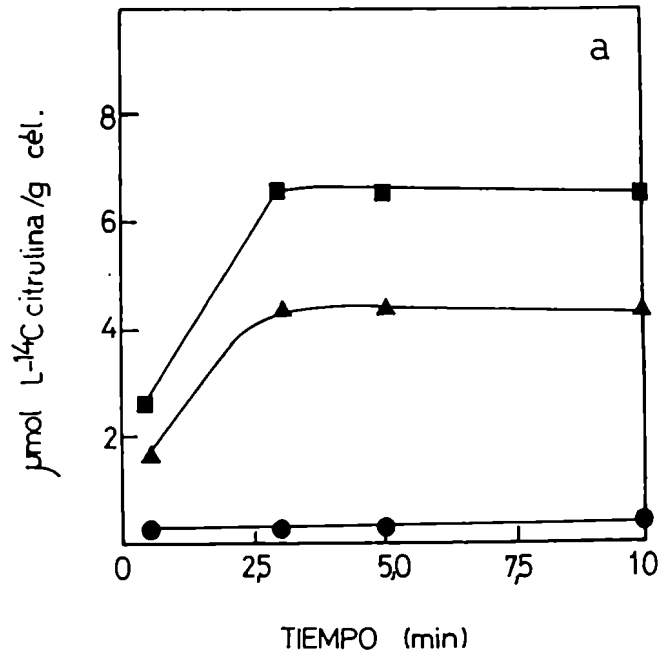


Figura 5.8.: Incorporación de L-citrulina en la cepa MMY2 crecida en medio VJNH₄⁺ (●), VJPro (■) ó VJLeu (▲).

Células energizadas por preincubación con D-glucosa. L-¹⁴C citrulina externa: 0,05 mM (a); 1,0 mM (b). A los tiempos indicados se tomaron alícuotas que se procesaron para la determinación de la radiactividad intracelular.

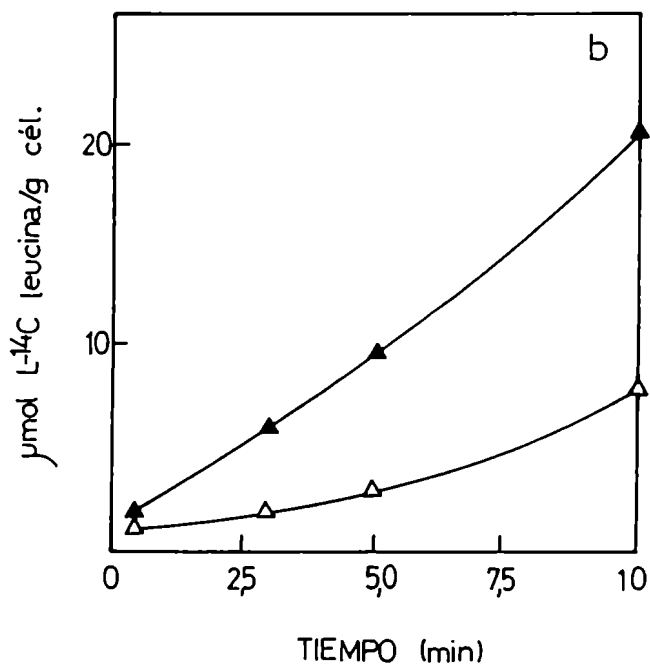
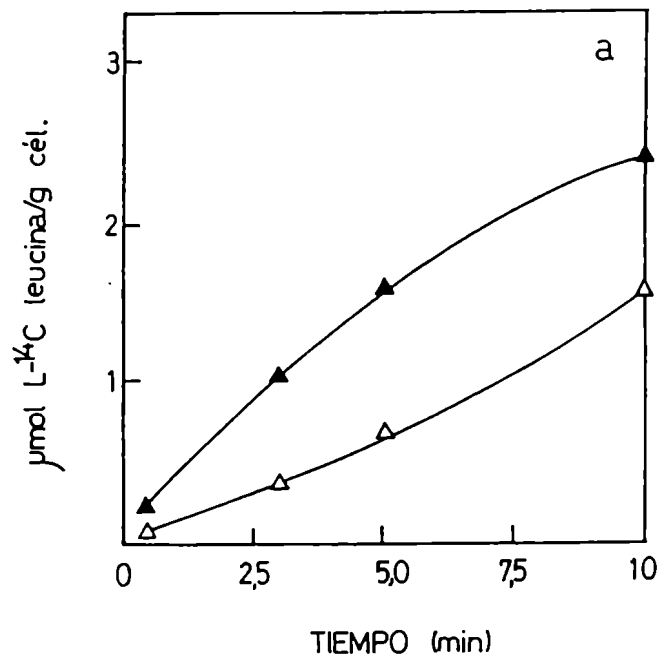


Figura 5.9.: Incorporación de L-leucina en la cepa MMY2/H3 crecida en medio VJLeu. Células ayunadas (Δ) ó energizadas por preincubación con D-glucosa (\blacktriangle). L-¹⁴C leucina externa: 0,05 mM (a); 1,0 mM (b). A los tiempos indicados se tomaron alícuotas que se procesaron para la determinación de la radiactividad intracelular.

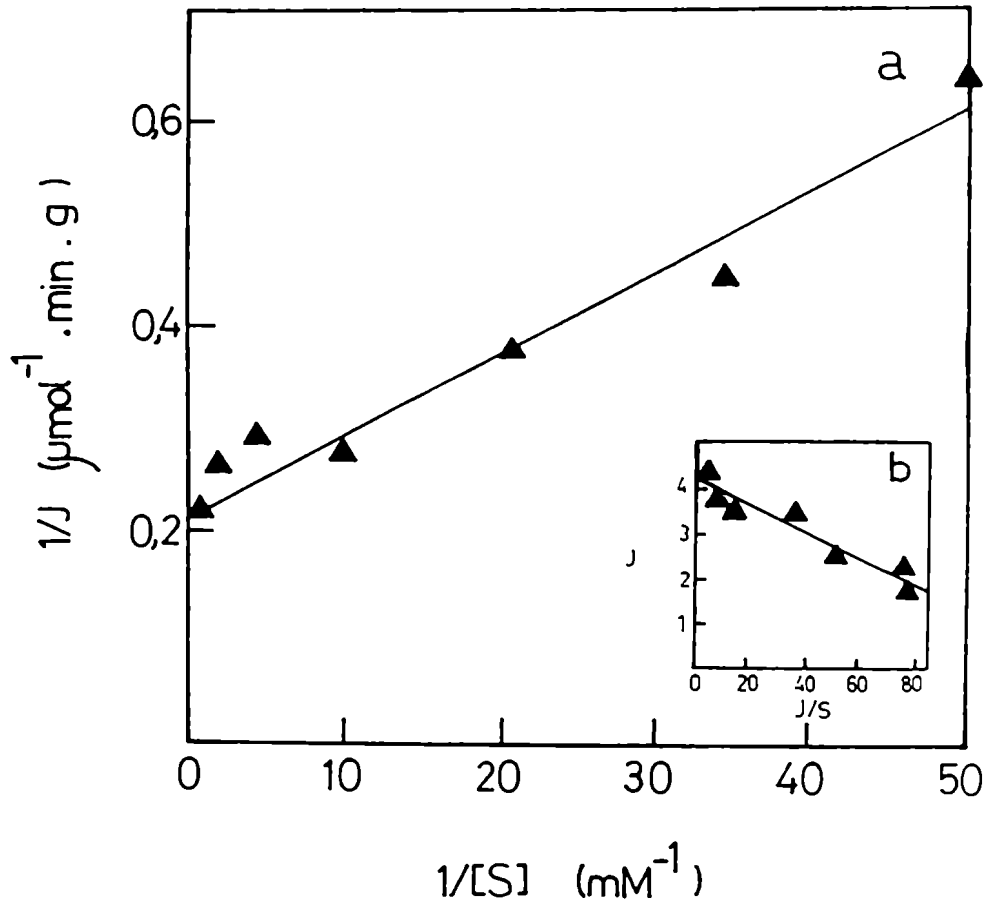


Figura 5.10.: Cinética de entrada de L-leucina en la cepa MMY2 crecida en medio VJLeu. Células energizadas por preincubación con D-glucosa. Representación de Lineweaver-Burk y Hofstee (inserto).

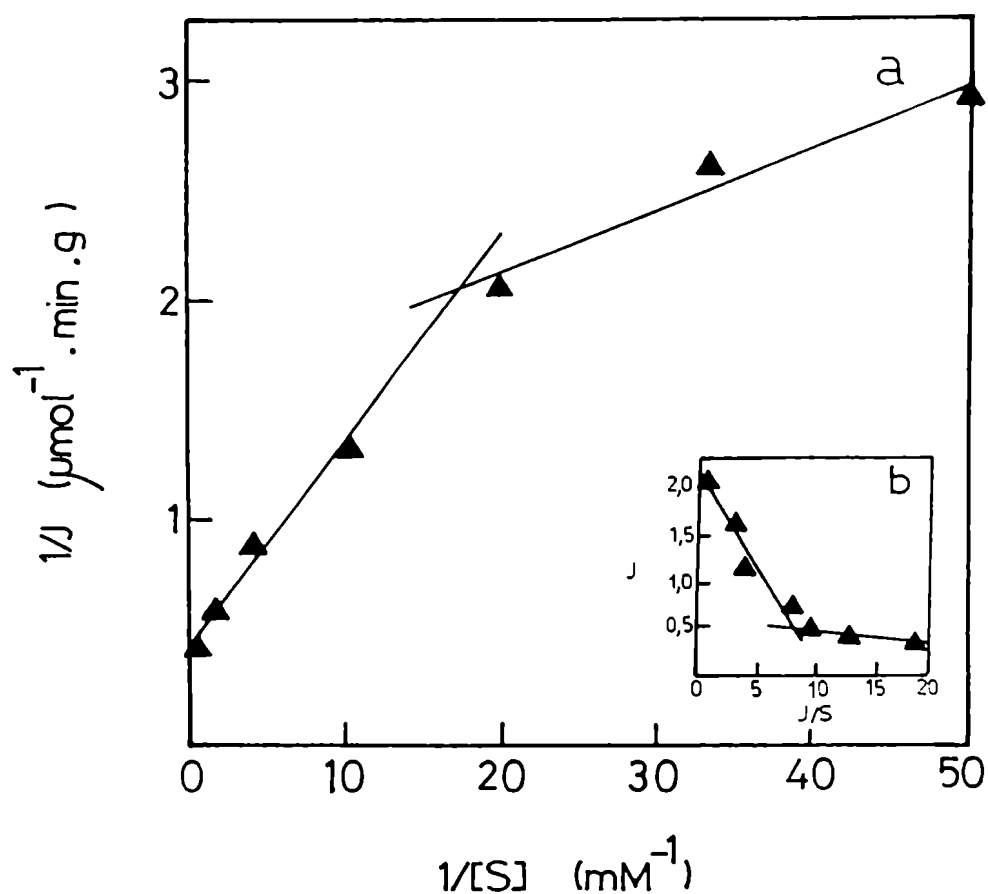


Figura 5.11.: Cinética de entrada de L-leucina en la cepa MMY2/H3 crecida en medio VJLeu. Células energizadas por preincubación con D-glucosa. Representación de Lineweaver-Burk y Hofstee (inserto).

Tabla 5.II.: Parámetros cinéticos de las cepas MMY2 y MMY2/H3.

Cepa	Medio de cultivo	K_T (mM)	J_{max} ($\mu\text{mol/g}\cdot\text{min}$)
MMY2	VJLeu	0,03	4,27
MMY2/H3	S ₁	0,02	0,63
	S ₂	0,20	2,20

Los valores se calcularon por el método de análisis de datos de Lineweaver-Burk según las representaciones de las figuras 5.10 y 5.11.

de L-¹⁴C leucina se realizaron en las cepas MMY2, MMY2/H3 y MMY2/LT1/GAP, crecidas en medios sintéticos con amonio o L-prolina como fuente de nitrógeno. Los experimentos se realizaron con dos concentraciones externas de L-¹⁴C leucina, 0,05 y 1,0 mM y concentraciones diez veces mayores del aminoácido competidor en el medio de incubación.

En células energizadas de la cepa silvestre crecidas en VJNH₄⁺, tabla 5.III. todos los aminoácidos ensayados a concentración externa (Ce) 0,05 mM disminuyen la entrada de L-¹⁴C leucina con excepción del ácido α-aminoisobutírico. Con la mayor concentración de la misma sólo la inhibición de metionina alcanza un 20%. Al crecer las células en medio VJPro el porcentaje de inhibición aumenta significativamente y es mayor a baja concentración externa del aminoácido radiactivo.

Ensayos similares se realizaron en la mutante gap, MMY2/H3, tabla 5.IV. En células crecidas en medio VJNH₄⁺ además del α-aminoisobutírico no se observa inhibición con el aminoácido L-citrulina.

En las células crecidas en medio VJPro esos aminoácidos no inhiben la entrada de L-¹⁴C leucina. Para los otros aminoácidos, los porcentajes de inhibición comparados en iguales condiciones con la cepa silvestre, son menores tanto a baja como alta concentración externa del aminoácido radiactivo.

La cepa MMY2/LT1/GAP no presenta actividad de los sistemas S₁ y S₂, operando para el transporte de L-leucina sólo el sistema general. La disminución producida por la L-citrulina en esta cepa se debe a una inhibición sobre el transporte a través del sistema general, tabla 5.V.

5.5. INCORPORACION DE L-¹⁴C LEUCINA EN MITOCONDRIAS DE LA CEPA MMY2.

Las mitocondrias de levadura transportan L-leucina que

Tabla 5.III.: Ensayos de competencia en la cepa MMY2.

Competidor	Medio de cultivo	[L-leucina] _e (mM)	
		0,05	1,0
Control	VJNH ₄ ⁺	0,329	3,060
L-leucina		0,220 (33,1)	2,690 (12,1)
L-valina		0,229 (30,4)	2,778 (9,2)
L-isoleucina		0,242 (26,4)	2,805 (8,3)
L-citrulina		0,248 (24,6)	3,112 (0)
Control		0,288	2,879
L-alanina		0,222 (22,9)	2,499 (13,2)
L-αAIB		0,266 (7,6)	2,711 (5,8)
L-metionina		0,204 (29,2)	2,297 (20,2)
Control	VJPro	2,065	8,174
L-leucina		0,531 (74,3)	5,450 (33,3)
L-valina		0,587 (71,6)	5,567 (31,9)
L-isoleucina		0,594 (71,2)	5,518 (32,5)
L-citrulina		0,867 (58,0)	6,198 (24,2)
Control		2,349	7,562
L-alanina		0,528 (77,5)	5,153 (31,8)
L-αAIB		2,114 (10,0)	6,535 (13,6)
L-metionina		0,477 (79,7)	3,558 (52,9)

Células energizadas por preincubación con D-glucosa.

Valores en μmol de L-¹⁴C leucina/g. p.s.cél. a T= 2,5 min.

Entre paréntesis porciento de inhibición.

Tabla 5.IV.: Ensayos de competencia en la cepa MMY2/H3.

Competidor	Medio cultivo	[L-leucina] _e (mM)	
		0,05	1,0
Control	VJNH ₄ ⁺	0,193	3,158
L-leucina		0,150 (22,3)	2,706 (14,3)
L-valina		0,170 (11,9)	2,618 (17,1)
L-isoleucina		0,154 (20,2)	2,697 (14,6)
L-citrulina		0,186 (3,6)	3,280 (0)
Control		0,249	3,146
L-alanina		0,220 (11,6)	2,762 (12,2)
L-αAIB		0,240 (3,6)	2,907 (7,6)
L-metionina		0,191 (23,3)	2,828 (10,1)
Control	VJPro	0,500	5,208
L-leucina		0,354 (29,2)	4,123 (20,8)
L-valina		0,419 (16,2)	4,277 (17,9)
L-isoleucina		0,321 (35,8)	4,130 (20,7)
L-citrulina		0,463 (7,4)	5,107 (1,9)
Control		0,609	5,133
L-alanina		0,466 (23,5)	4,353 (15,2)
L-αAIB		0,610 (0)	5,200 (0)
L-metionina		0,321 (47,3)	3,716 (27,6)

Células energizadas por preincubación con D-glucosa.

Valores en μmol de L-¹⁴C leucina/g. p.s.cél. a T= 2,5 min.

Entre paréntesis porciento de inhibición.

Tabla 5.V.: Ensayos de competencia en la cepa MMY2/LT1/GAP.

Competidor	Medio de cultivo	[L-leucina] e (mM)	
		0,05	1,0
Control	VJNH ₄ ⁺	0,282	2,565
L-leucina		0,171 (39,4)	2,350 (8,4)
L-citrulina		0,191 (32,2)	2,598 (0)
Control	VJPro	5,559	13,236
L-leucina		1,219 (78,1)	4,226 (68,1)
L-citrulina		2,636 (52,6)	7,105 (46,3)

Células energizadas por preincubación con D-glucosa.
 Valores en μmol de L-¹⁴C leucina/g. p.s.cél. a T= 2,5 min.
 Entre paréntesis porciento de inhibición.

utilizan para el proceso de biosíntesis de proteínas.

Para conocer si el transporte mitocondrial es significativo frente al transporte a través de la membrana plasmática, se determinó la entrada del aminoácido en mitocondrias aisladas a partir de protoplastos. El ensayo se realizó utilizando mitocondrias en concentración de 3,8 mg de proteína/ml, manitol 0,54 M y amortiguador HEPES 20 mM, pH 7. La concentración externa de L-leucina correspondió a 1,0 mM y se usaron filtros Gelman de 0,45 μ m de poro. Los filtros se lavaron con solución fría de manitol 0,8 M y se determinó la radiactividad en forma análoga a las células enteras. A T_{0+30^s} se obtuvo un valor de 7,2 μ mol/g.prot., a $T_{0+3^{\text{min}}}$ 10,6 μ mol/g.prot. y a $T_{0+6^{\text{min}}}$ 13,3 μ mol/g.prot.

El transporte no resultó estimulado por el consumo de α -cetoglutarato en concentración final igual a 10 mM.

6. SISTEMAS TRANSPORTADORES DE L-LEUCINA EN S.CEREVISIAE
CEPA MMY2/H3/LT1 Y EN CEPAS OBTENIDAS DEL CRUCE
MMY2/H3/LT1 X D-28.

6.1. INCORPORACION Y ENTRADA DE L-¹⁴C LEUCINA EN LA CEPA
MMY2/H3/LT1.

La cepa MMY2/H3/LT1 es una mutante deficiente en el transporte de L-leucina; fue aislada a partir de la mutante gap, MMY2/H3 en presencia de trifluorleucina (TFL) 50 μ M. En la preparación se aislaron 30 cepas; los ensayos de incorporación, entrada y competencia confirmaron que la resistencia al análogo tóxico de la L-leucina, se debe a una deficiencia en el proceso de transporte (Kotliar N. comunicación personal).

En células crecidas en medio Wickerham energizadas, figura 6.1., la incorporación de L-¹⁴C leucina no es concentrativa para las dos concentraciones externas del aminoácido. Los valores de entrada son ocho veces menores que los de la cepa silvestre MMY2 y la mutante gap, MMY2/H3 ya descritos, figura 5.1.

6.2. PARAMETROS CINETICOS DE LOS SISTEMAS TRANSPORTADORES

El estudio de las cinéticas de entrada en células crecidas en medio $VJNH_4^+$ y VJPro permiten caracterizar un solo sistema para el transporte del aminoácido, figura 6.2. Los valores calculados para K_T y J_{max} presentados en la tabla 6.I., indican una baja afinidad por el sustrato en levaduras provenientes de los medios y una baja velocidad de transporte, aún en el caso de crecimiento en VJPro.

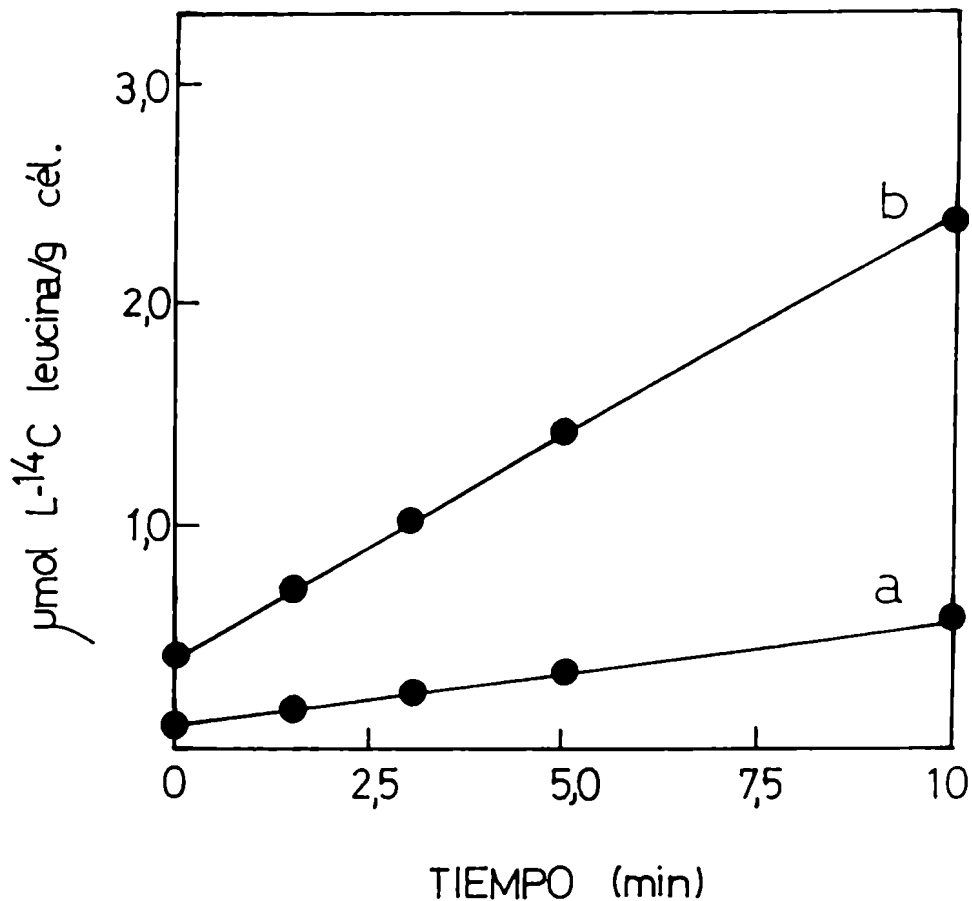


Figura 6.1.: Incorporación de L-leucina en la cepa MMY2/H3/LT1 crecida en medio Wickerham. Células energizadas por preincubación con D-glucosa. L-¹⁴C leucina externa: 0,05 mM (a); 1,0 mM (b). A los tiempos indicados se tomaron alicuotas que se procesaron para la determinación de la radiactividad intracelular.

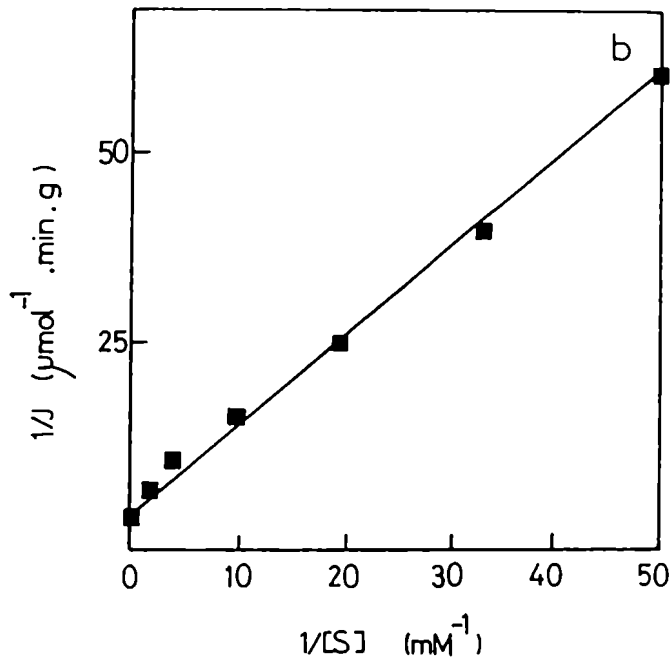
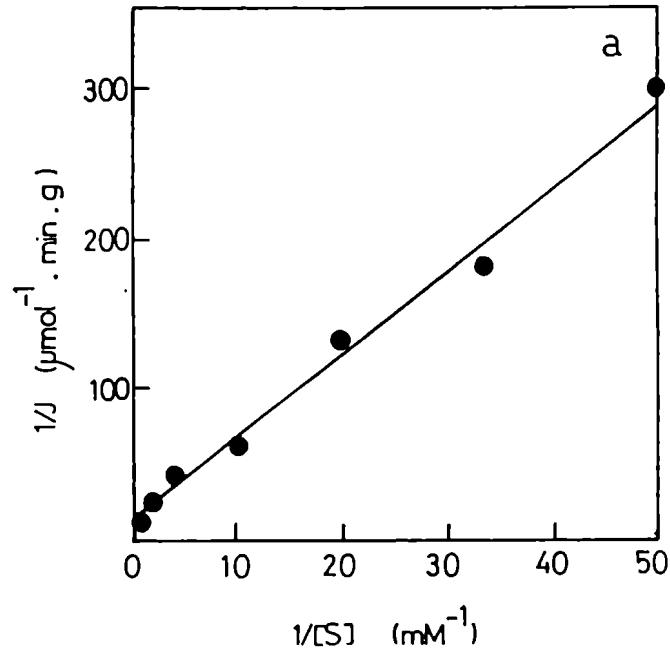


Figura 6.2.: Cinética de entrada de L-leucina en la cepa MMY2/H3/LT1 crecida en medio VJNH_4^+ (●) ó VJPro (■).

Células energizadas por preincubación con D-glucosa. Representaciones de Lineweaver-Burk.

Tabla 6.1.: Parámetros cinéticos de la cepa MMY2/H3/LT1.

Cepa	Medio de cultivo	K_T (mM)	J_{max} ($\mu\text{mol/g}\cdot\text{min}$)
MMY2/H3/LT1	VJNH ₄ ⁺	0,46	0,08
	VJPro	0,21	0,20

Los valores se calcularon por el método de análisis de datos de Lineweaver-Burk según las representaciones de la figura 6.2.

6.3. ENTRADA DE L-¹⁴C LEUCINA EN LAS CEPAS OBTENIDAS DEL CRUCE MMY2/H3/LT1 X D-28

Como se ha descrito, la mutación presente en la cepa MMY2/H3/LT1 modifica la cinética de incorporación de L-leucina.

Con el fin de investigar las mutaciones que afectan la actividad de los sistemas de transporte de L-leucina, se estudió la cinética de entrada en cepas haploides obtenidas del cruce de la cepa D-28 GAL2, lys2, GAP con la cepa MMY2/H3/LT1, defectiva en la GAP, S₁ y/o S₂.

En células D-28, crecidas en medio Wickerham se caracterizan dos sistemas para el transporte de L-leucina. Sus parámetros cinéticos $K_{T1} = 0,02$ mM, $J_{max} = 0,86$ μ mol L-leu/g.min; $K_{T2} = 0,20$ mM, $J_{max} = 2,36$ μ mol L-leu/g.min, son similares a los obtenidos con la cepa silvestre MMY2.

En el análisis de tetradas para conocer si el sistema GAP había segregado en forma 2:2, se midió la incorporación a 5 min y la entrada de L-¹⁴C citrulina.

En la figura 6.3. se observan los resultados obtenidos en las tetradas denominadas GA8-3 y GA8-8, crecidas en medio VJPro en que se desreprime la actividad de la GAP. En dos haploides de cada tetrada, la entrada a T₀₊₃ min es concentrativa; en las otras dos haploides los valores de Ci/Ce están por debajo de la unidad.

Si la disminución de la actividad de transporte, en la cepa MMY2/H3/LT1 se debe a una mutación que afecta un solo gen, se deberían encontrar en las tetradas obtenidas, sólo dos haploides con actividad de transporte disminuída, con respecto a las cepas silvestres.

Las determinaciones realizadas para las tetradas GA8-3 y GA8-8, en células crecidas en medio Wickerham, permiten caracterizar cinéticamente los sistemas presentes en cada cepa haploide.

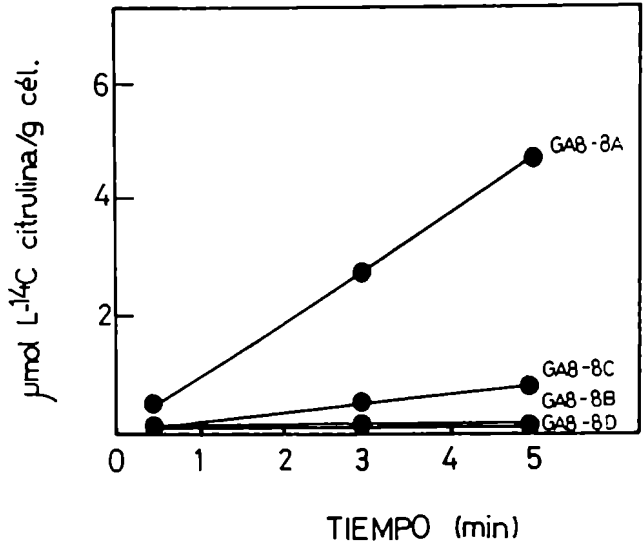
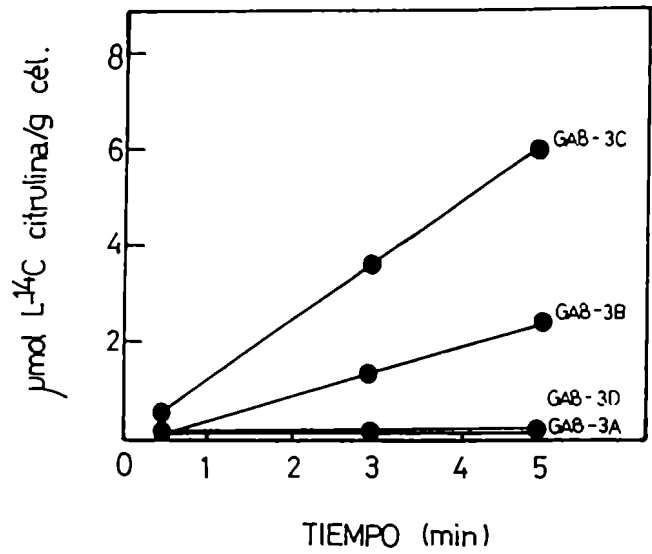


Figura 6.3.: Incorporación de L-citrulina en tetradas GAB
 crecidas en medio VJPro.
 Células energizadas por preincubación con D-glucosa. L-¹⁴C ci-
 trulina externa: 0,05 mM. A los tiempos indicados se tomá-
 ron alícuotas que se procesaron para la determinación de la
 radiactividad intracelular.

En la tabla 6.II. se observa que en la tetrada GA8-3, sólo en una cepa, la GA8-3A hay una baja actividad para el transporte del aminoácido. Teniendo en cuenta que también es mutante gap, esta cepa tiene características cinéticas similares a las de MMY2/H3/LT1, tabla 6.II. En la otra cepa mutante gap, la GA8-3D, opera un solo sistema con baja afinidad y alta velocidad máxima. En las restantes cepas los parámetros cinéticos indican la operación de dos sistemas de entrada.

En la tetrada GA8-8 hay dos cepas con baja actividad de transporte, la GA8-8B y la GA8-8C. Esta última cepa tiene un sistema GAP funcional, pero debido a su crecimiento en medio rico, su actividad se encuentra reprimida. Las cepas GA8-8A y GA8-8D tienen sistemas de baja afinidad pero difieren en los valores de velocidad máxima.

Los datos expuestos de las determinaciones cinéticas en estas cepas, no permiten inferir que la mutación de un solo gen, sea responsable de la baja actividad de transporte de la cepa MMY2/H3/LT1.

Tabla 6.II.: Parámetros cinéticos de tetradas del cruce MMY2/H3/LT1 x D-28

Cepa	K_T (mM)	J_{max} ($\mu\text{mol/g}\cdot\text{min}$)	K_T (mM)	J_{max} ($\mu\text{mol/g}\cdot\text{min}$)
GAB-3A#	0,38	0,29		
3B	0,03	0,23	0,58	1,15
3C	0,07	1,24	0,33	3,63
3D#	0,26	3,58		
GAB-8A	0,31	1,06		
8B#	0,03	0,04	0,87	0,37
8C	0,04	0,24		
8D#	0,54	3,97		
MMY2/H3/LT1#	0,45	0,31		
D-28	0,02	0,86	0,20	2,36

Cepas mutantes gap.

Células crecidas en medio Wickerham energizadas por preincubación con D-glucosa.

7. TRANSPORTE DE L-LEUCINA Y GRADIENTE DE PROTONES EN CEPAS MUTANTES DEFICIENTES RESPIRATORIAS.

7.1. INCORPORACION Y ENTRADA DE L-¹⁴C LEUCINA EN CEPAS JB65 rho⁻

Como se indicó en la Introducción el estudio de la entrada e incorporación de L-¹⁴C leucina en S.cerevisiae mutantes deficientes respiratorias, rho⁻, permitió discriminar el aporte energético de procesos mitocondriales y del citosol.

Una comparación entre la actividad de los sistemas transportadores en las cepas silvestres y sus mutantes rho⁻, en condiciones de distinta carga energética, constituye un material importante para indagar la relación entre entrada de L-leucina y gradiente de protones a través de la membrana. Además ese estudio en dobles mutantes, de transporte y deficientes respiratorias, son útiles para avanzar en la relación entre el ΔpH y la actividad de los distintos sistemas de transporte.

Los experimentos se realizaron en mutantes JB65 rho⁻₁, JB65 rho⁻₂, JB65 rho⁻₃ y MMY2/H3 rho⁻ obtenidas a partir de las cepas parentales por el método de BrEt. Las cepas deficientes respiratorias JB65 rho⁻ se aislaron de colonias crecidas en medio sólido YPDA.

La mutante denominada JB65 rho⁻₁ se aisló de una colonia de 2,5 mm de diámetro, la mutante JB65 rho⁻₂ de una colonia de 2,0 mm y la mutante JB65 rho⁻₃ de una colonia de 1,0 mm. A diferencia de la cepa silvestre, no pueden utilizar maltosa como fuente de carbono.

Las dos primeras mutantes mencionadas crecen en medio rico, alcanzando un rendimiento de 1 mg p.s.cél/ml de medio de cultivo. En el caso de la mutante JB65 rho⁻₃ el rendimiento fue de 0,6 mg p.s.cél/ml.

Para los ensayos de incorporación y entrada de L-¹⁴C leu

cina, las células crecieron en medio rico Wickerham, se ayunaron y se energizaron por preincubación con glucosa, como se describió en Materiales y Métodos.

Las determinaciones de incorporación de $L\text{-}^{14}\text{C}$ leucina demuestran que los valores de ésta son muy bajos en células ayunadas y no es posible establecer una cinética de entrada.

En el caso de células energizadas de la cepa JB65 rho^{-1} , figura 7.1., el proceso de entrada no es concentrativo, así para T_{0+4} min, con la menor concentración externa del aminoácido se obtiene un valor de $0,120 \mu\text{mol/g p.s.cél.}$ mientras que con la mayor concentración externa es $0,795 \mu\text{mol/g p.s.cél.}$ En las cepas JB65 rho^{-2} y JB65 rho^{-3} el proceso es concentrativo; a T_{0+4} min la relación C_i/C_e es 6 y 1,2-1,3 para la menor y la mayor concentración externa de $L\text{-}^{14}\text{C}$ leucina, respectivamente.

7.2. PARAMETROS CINÉTICOS DE LOS SISTEMAS TRANSPORTADORES

Los experimentos se realizaron con células crecidas en medio Wickerham y energizadas en las mismas condiciones que las descritas para la figura 7.1.

Los valores obtenidos en repetidos experimentos, para la cepa JB65 rho^{-1} , no permitieron establecer una cinética de entrada y calcular los parámetros cinéticos K_T y J_{max} .

En cambio, en las cepas JB65 rho^{-2} y JB65 rho^{-3} , las representaciones de Lineweaver-Burk y Hofstee, figura 7.2. indican la existencia de dos sistemas para el transporte del aminoácido.

Por el método de análisis de datos de Lineweaver-Burk, se obtuvieron los valores de los parámetros cinéticos, que se presentan en la tabla 7.I. En las dos cepas no se observan modificaciones en la afinidad de los sistemas

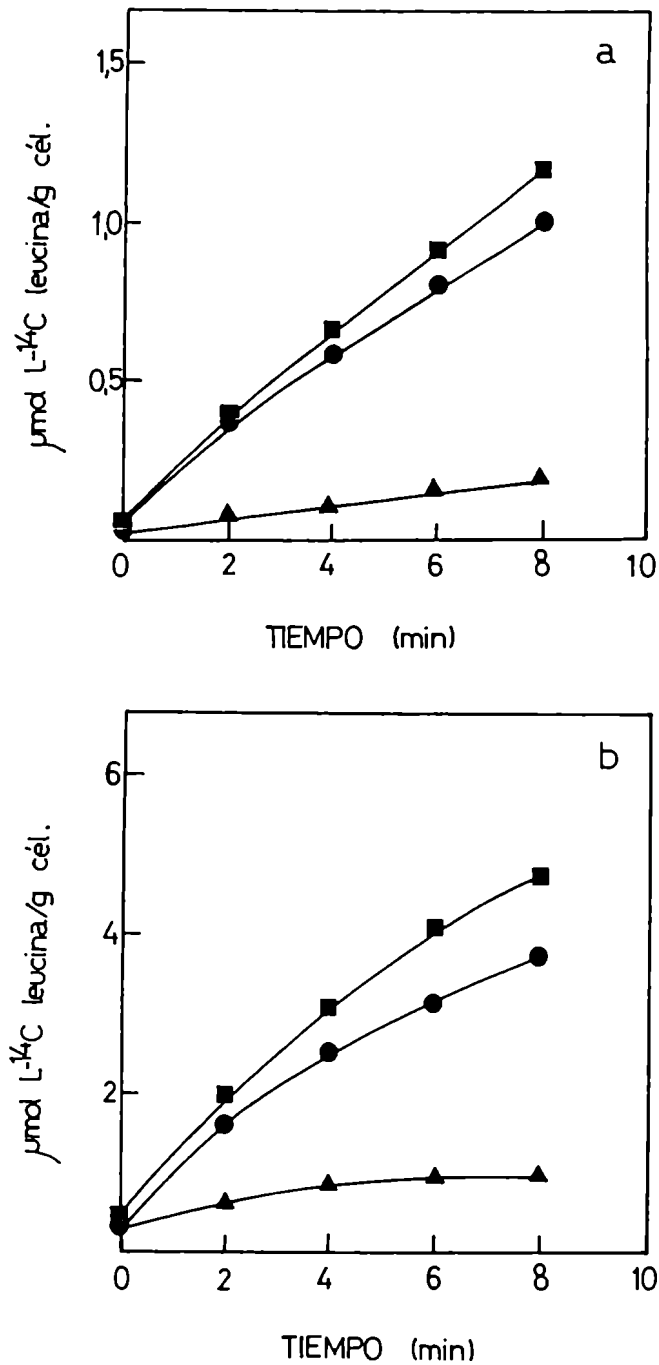


Figura 7.1.: Incorporación de L-leucina en cepas deficientes respiratorias.

Células crecidas en medio Wickerham, energizadas por preincubación con D-glucosa, JB65 ρ^{-1} (\blacktriangle), JB65 ρ^{-2} (\bullet), JB65 ρ^{-3} (\blacksquare). L-¹⁴C leucina externa: 0,05 mM (a); 1,0 mM (b). A los tiempos indicados se tomaron alícuotas que se procesaron para la determinación de la radiactividad intracelular.

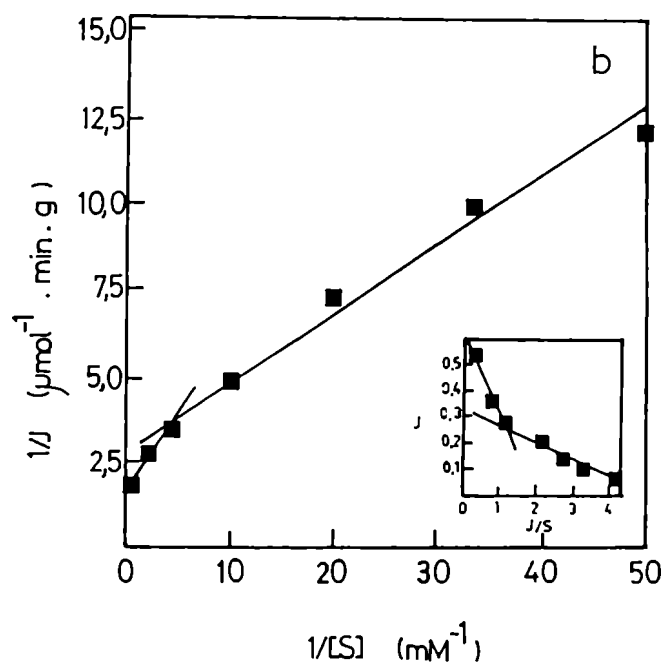
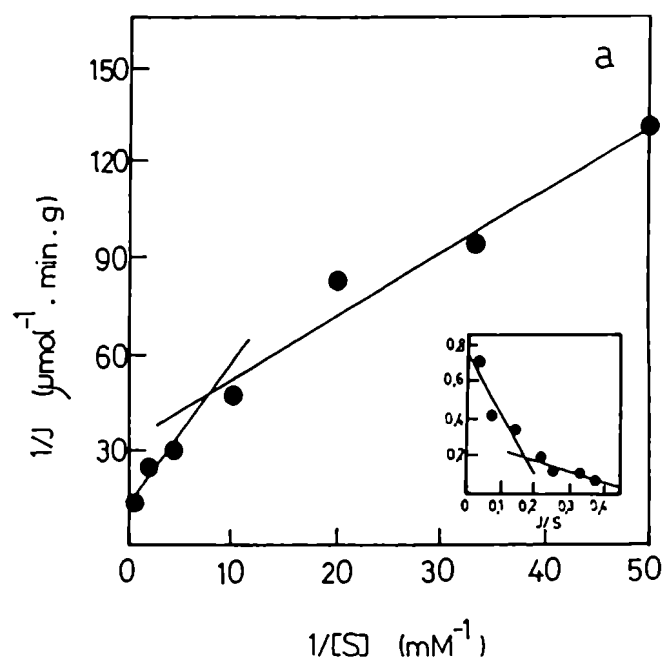


Figura 7.2.: Cinética de entrada de L-leucina en las cepas JB65 ρ^-_2 (●) y JB65 ρ^-_3 (■). Células crecidas en medio Wickerham, energizadas por preincubación con D-glucosa. Representaciones de Lineweaver-Burk y Hofstee (inserto).

Tabla 7.1.: Parámetros cinéticos de las cepas JB65 rho² y JB65 rho³.

Cepa	Medio de cultivo	K _T (mM)	J _{max} (μmol/min.g)
JB65 rho ³	Wickerham	0,086	0,382
		0,273	0,585
JB65 rho ²	Wickerham	0,059	0,030
		0,349	0,076

Los valores se calcularon por el método de análisis de datos de Lineweaver-Burk según las representaciones de la figura 7.2.

con respecto a los valores calculados para la cepa silvestre JB65 ($K_{T1} = 0,034$ mM y $K_{T2} = 0,41$ mM) (76). En los valores de J_{max} se encuentra una disminución con respecto a la cepa parental JB65 ($J_{max1} = 0,53$ $\mu\text{mol/g}\cdot\text{min}$, $J_{max2} = 1,59$ $\mu\text{mol/g}\cdot\text{min}$). La diferencia es más notable en la cepa JB65 ρ^{-2} , para la cual las velocidades disminuyen en un 95 por ciento con respecto a las de la cepa JB65.

7.3. SALIDA DE PROTONES EN CELULAS CON CONSUMO DE GLUCOSA

Para establecer si la diferente actividad de los sistemas de transporte de $L\text{-}^{14}\text{C}$ leucina en las tres cepas deficientes respiratorias, se debe a una baja actividad de la H^+ -ATPasa de membrana citoplasmática con respecto a la cepa silvestre, se midió la modificación del pHe por consumo de glucosa, en células suspendidas en FHK 4 mM; concentración que permite una medida eficiente de la salida de protones.

Como se observa en la tabla 7.II., en células ayunadas, el agregado de glucosa en concentración final 5 mM, provoca una salida neta de protones medida hasta $T_{0+10\text{min}}$, del mismo orden para las cepas mutantes y la cepa parental. En controles realizados sin agregado de glucosa, hay una disminución en el valor del pHe de 0,01-0,02 unidades, que corresponde a 7 y 10 nmoles de protones/mg p.s.cél respectivamente.

Tampoco se observan diferencias en los valores para células energizadas. Los valores de nmoles de protones medidos son un 30 a 50 por ciento menores que los valores en células ayunadas, tabla 7.II.

Teniendo en cuenta que, además de la actividad de la H^+ -ATPasa hay otros procesos como la salida de ácidos orgánicos involucrados en la acidificación del medio externo

Tabla 7.II.: Salida de protones por agregado de D-glucosa

Cepa	Condición metabólica	
	Ayunadas	Preincubadas
JB65 rho ⁻ 1	156	62
JB65 rho ⁻ 2	190	95
JB65 rho ⁻ 3	160	56
JB65	169	77

Células ayunadas ó energizadas por preincubación con D-glucosa se resuspendieron en FHK 5 mM, pH 4,5. A T= 0 se agregó D-glucosa en concentración final 5 mM. Valores de nmoles de H⁺/mg. p.s.cél hasta 10 min.

(126,127) se midió la salida de protones en presencia de dietilstilbestrol (DESE), un inhibidor de la actividad de la H^+ -ATPasa citoplasmática (128,129).

En células deficientes respiratorias, el DESE concentración externa $50 \mu\text{g/ml}$, inhibe un 50 por ciento la salida neta de protones, por agregado de glucosa a T_{0+5} min. En las condiciones ensayadas, la actividad de la H^+ -ATPasa es responsable en parte de la acidificación del medio externo y su actividad es similar en las tres cepas deficientes respiratorias.

7.4. EFECTO DEL 2,4-DINITROFENOL SOBRE LOS VALORES DE ENTRADA DE $L-^{14}\text{C}$ LEUCINA Y EL PH INTERNO

Para el transporte de aminoácidos se considera que, la energía acumulada en el gradiente electroquímico de protones ($\Delta \tilde{\mu}_{H^+}$) actúa como fuerza impulsora del proceso. Por el método de distribución intra-extracelular del ácido benzoico, se determinó el pH interno (pH_i) en las cepas deficientes respiratorias ayunadas y en las energizadas.

En los tres casos, tabla 7.III., se obtienen valores similares de pH_i . Teniendo en cuenta que el pH_e es 4,5 y que no se modifica durante la determinación, en las tres cepas el valor de ΔpH está en el orden de 1,6 unidades, 94,4 mV.

La inhibición de la incorporación y entrada de L-leucina por acción de desacoplantes como el 2,4-dinitrofenol (DNP), ha sido descripta por varios autores (110,124,130).

En las tres cepas deficientes respiratorias, se estudió el efecto del DNP $50 \mu\text{M}$, sobre la entrada de L-leucina. En la tabla 7.IV. se observa que a T_{0+4} min la inhibición producida en las cepas JB65 ρ_2^- y JB65 ρ_3^- es del 50 por ciento para las dos concentraciones externas de L-leucina.

Tabla 7.III.: Efecto de la preincubación con D-glucosa sobre el pH_i en las cepas JB65.

Cepa	Condición metabólica	pH_i	ΔpH (mV)
JB65 rho ⁻ 1	Ayunada	5,50	1,00 (59)
	Energizada	6,11	1,61 (95)
JB65 rho ⁻ 2	Ayunada	5,55	1,05 (62)
	Energizada	6,12	1,62 (96)
JB65 rho ⁻ 3	Ayunada	5,63	1,13 (67)
	Energizada	6,10	1,60 (94)
JB65	Ayunada	5,90	1,40 (83)
	Energizada	6,23	1,73(102)

Células crecidas en medio Wickerham.

Tabla 7.IV.: Efecto del DNP sobre la entrada de L-leucina en las cepas JB65.

Cepa	Adición 50 μ M	[L-leucina] e 0,05 mM	[L-leucina] e 1,0 mM
JB65 rho ⁻ 1	---	0,122	0,795
	DNP	0,078 (36,1)	0,687 (13,6)
JB65 rho ⁻ 2	---	0,587	2,546
	DNP	0,274 (53,3)	1,321 (48,1)
JB65 rho ⁻ 3	---	0,677	3,141
	DNP	0,353 (47,9)	1,757 (44,1)

Células crecidas en medio Wickerham y energizadas por preincubación con D-glucosa.
 Valores en μ mol de L-¹⁴C leucina a T = 4 min.
 Entre paréntesis porcentaje de inhibición.

En la cepa JB65 ρ^-_1 la disminución es del 36 por ciento para la menor concentración y del 14 por ciento para la mayor concentración externa del aminoácido.

El agregado del protonóforo, en concentración final 50 μM disminuye el valor del pH_i en 0,10 unidades, sin modificar el valor del pH_e , tabla 7.V. En estas condiciones el ΔpH es igual a 1,5 unidades, 88,5 mV. El DNP disminuye en un 20 por ciento el valor inicial de la relación $[\text{H}^+]_{\text{ext}}/[\text{H}^+]_{\text{int}}$, de un valor de 39,8 a un valor de 31,6.

7.5. INCORPORACION Y ENTRADA DE $\text{L-}^{14}\text{C}$ LEUCINA EN LAS CEPAS MMY2/H3 y MMY2/H3 ρ^-

Para las cepas JB65 y las mutantes deficientes respiratorias, el aporte energético mantiene la actividad de los sistemas GAP, S_1 y S_2 . El aporte proviene de la vía mitocondrial y citosólica o sólo citosólica.

En el medio rico Wickerham, como se describió, la actividad de la GAP es baja con respecto al medio VJPro y el transporte es mediado principalmente por los sistemas S_1 y S_2 . Teniendo en cuenta estas determinaciones se decidió aislar cepas deficientes respiratorias a partir de la mutante gap MMY2/H3 para evaluar la contribución energética en ausencia de la GAP.

Las mutantes fueron preparadas como se describió en Materiales y Métodos en presencia de tres concentraciones de BrEt (50, 75 y 100 $\mu\text{g/ml}$).

Para cada concentración de BrEt se aislaron tres cepas, numerándose a partir de la concentración 50 $\mu\text{g/ml}$. Las cepas deficientes respiratorias y la cepa parental crecieron en medio rico Wickerham y se determinó la entrada de L-leucina utilizando dos concentraciones externas del aminoácido.

Los valores obtenidos, tabla 7.VI., indican que la en-

Tabla 7.V.: Efecto del DNP sobre el pH_i en las cepas JB65.

Cepa	Adición 50 μM	pH_i	ΔpH (mV)
JB65 rho ⁻ 1	---	6,11	1,61 (95)
	DNP	6,02	1,52 (90)
JB65 rho ⁻ 2	---	6,12	1,62 (96)
	DNP	6,00	1,50 (89)
JB65 rho ⁻ 3	---	6,10	1,60 (94)
	DNP	5,98	1,48 (87)

Células crecidas en medio Wickerham y energizadas por preincubación con D-glucosa.

Tabla 7.VI.: Entrada de L-leucina en las cepas MMY2/H3

Cepa	[L-leucina] e (0,05 mM)		[L-leucina] e (1,0 mM)	
	2 min	4 min	2 min	4 min
MMY2/H3	0,201	0,303	1,409	2,048
MMY2/H3 rho ⁻ ₁	0,351	0,580	2,877	4,148
MMY2/H3 rho ⁻ ₂	0,354	0,571	2,632	4,850
MMY2/H3 rho ⁻ ₃	0,300	0,472	2,018	3,908
MMY2/H3 rho ⁻ ₄	0,289	0,490	2,719	4,104
MMY2/H3 rho ⁻ ₅	0,500	0,860	3,781	5,290
MMY2/H3 rho ⁻ ₆	0,506	0,800	4,085	6,050
MMY2/H3 rho ⁻ ₇	0,210	0,321	1,691	2,643
MMY2/H3 rho ⁻ ₈	0,230	0,329	1,210	1,474
MMY2/H3 rho ⁻ ₉	0,493	0,755	3,330	5,101

Células crecidas en medio Wickerham y energizadas por preincubación con D-glucosa.

trada es similar en todas las cepas aisladas. Para estas mutantes haploides no se encontró cepa alguna que presentara deficiencia para el transporte del aminoácido. Los efectos de la preincubación con glucosa o etanol se estudiaron en la cepa denominada MMY2/H3 ρ_4^- .

En la cepa parental, MMY2/H3, figura 7.3., la preincubación con glucosa (concentración final 5 mM) o con etanol (concentración final 10 mM) produce un aumento en los valores de entrada con respecto a las células ayunadas.

Con glucosa la relación de concentración interna a externa a T_{O+4} min es igual a 22 para L-leucina externa 0,05 mM y de 6,5 con L-leucina externa 1,0 mM. Para la preincubación con etanol los valores son menores e iguales a 12 y 3,3 respectivamente. En células de la doble mutante MMY2/H3 ρ_4^- preincubadas con glucosa, figura 7.4., la relación C_i/C_e para la menor concentración es igual a 18 y de 4 con la concentración mayor. En esta cepa la preincubación con etanol no produce efecto sobre la entrada de L-leucina por los sistemas S_1 y S_2 . La deficiencia en el funcionamiento de la mitocondria impide el aporte de energía a través de la metabolización del etanol.

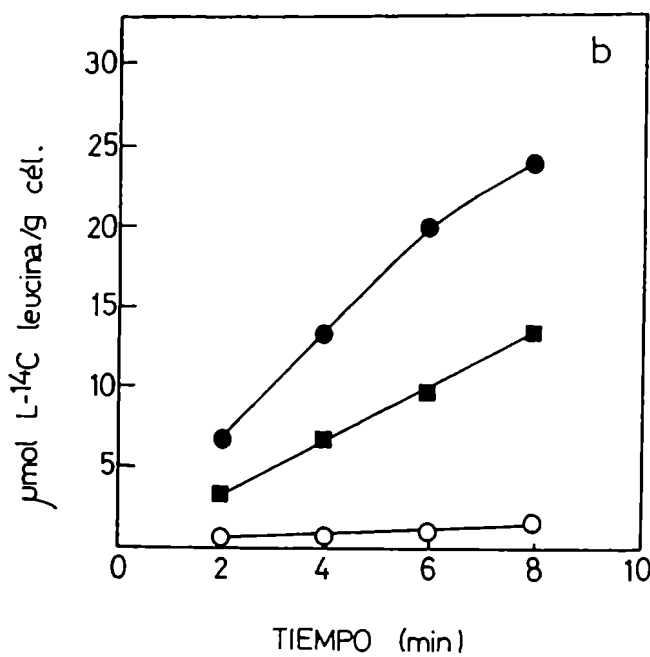
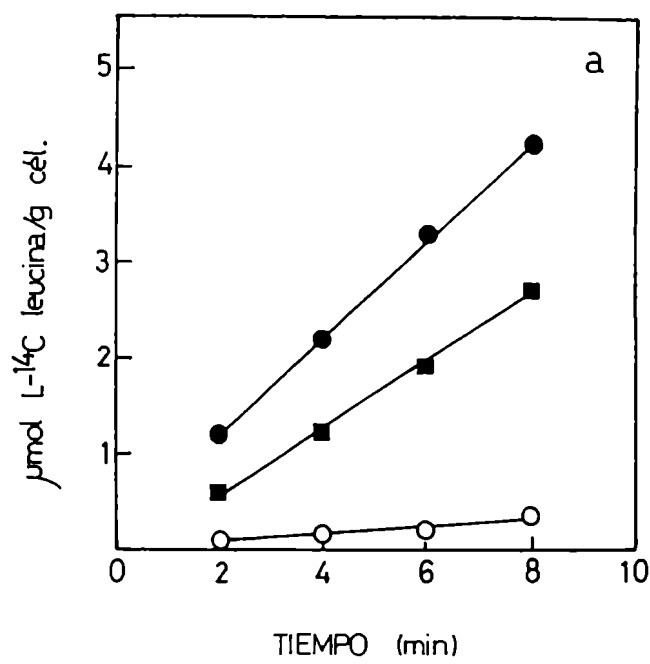


Figura 7.3.: Incorporación de L-leucina en la cepa MMY2/H3 crecida en medio Wickerham.

Células ayunadas (O) ó preincubadas con D-glucosa 5 mM (●) ó etanol 10 mM (■). L-¹⁴C leucina externa: 0,05 mM (a); 1,0 mM (b). A los tiempos indicados se tomaron alícuotas que se procesaron para la determinación de la radiactividad intracelular.

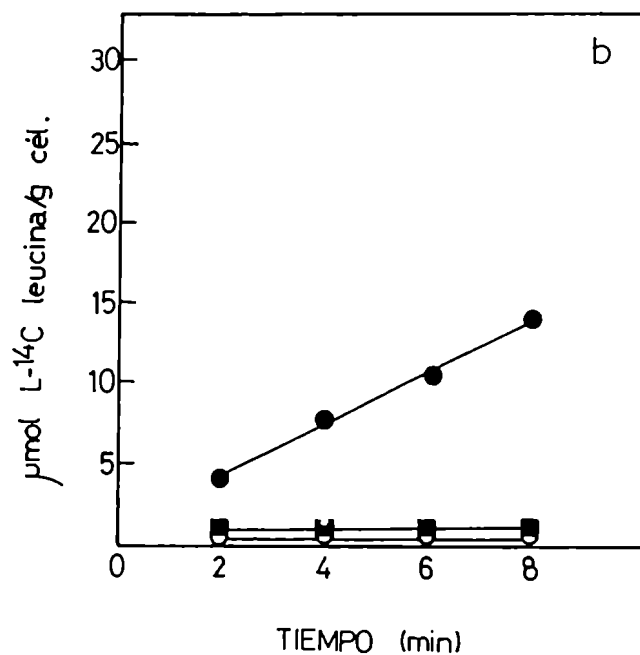
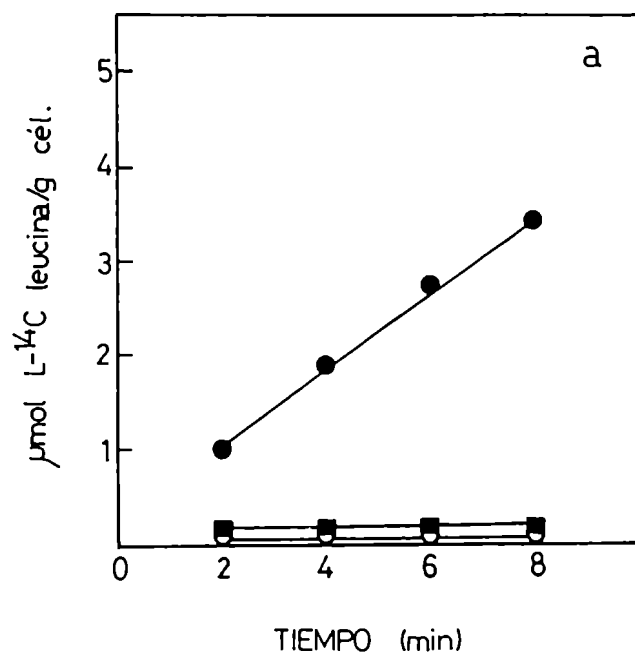


Figura 7.4.: Incorporación de L-leucina en la cepa MMY2/H3 rho₄ crecida en medio Wickerham.

Células ayunadas (○) ó preincubadas con D-glucosa 5 mM (●) ó etanol 10 mM (■). L-¹⁴C leucina externa: 0,05 mM (a); 1,0 mM (b). A los tiempos indicados se tomaron alícuotas que se procesaron para la determinación de la radiactividad intracelular.

8. EFFECTO DE LA CONCENTRACION DE PROTONES DEL MEDIO SOBRE LA ACTIVIDAD DE LOS SISTEMAS TRANSPORTADORES GAP, S₁ Y S₂

8.1. ENTRADA DE L-¹⁴C LEUCINA A DIFERENTES VALORES DE PH EXTERNO.

El efecto del pHe sobre la actividad de los sistemas transportadores de L-leucina se estudió en las cepas MMY2, MMY2/H3 y en MMY2/LT1/GAP. Como se describió anteriormente, la segunda cepa no presenta actividad del sistema general y la tercera cepa tiene disminuída la incorporación del aminoácido a través de los sistemas S₁, S₂. Las cepas crecieron en medio de cultivo rico Wickerham y en medio sintético VJNH₄⁺ o VJPro. La fuente de nitrógeno en estos dos últimos medios al reprimir o desreprimir la actividad del sistema general, permite estudiar el efecto del pHe en cepas silvestres como la MMY2, donde están presentes los tres sistemas para el transporte de L-leucina.

En células energizadas de la cepa MMY2 crecidas en medio Wickerham, figura 8.1., los valores de entrada no varían con el pHe en las dos concentraciones externas de L-leucina ensayadas. Con la menor concentración, la relación Ci/Ce es 12 y es de 2,5 para la mayor concentración. En células provenientes del medio VJNH₄⁺ hay una menor entrada del aminoácido y no se observan modificaciones en los valores de entrada por el pHe. La relación Ci/Ce es de 2,5 para la menor concentración y de 0,35 con la concentración 1,0 mM.

En células crecidas en medio VJPro hay una mayor entrada de L-¹⁴C leucina al variar el pHe. Para la menor concentración la relación Ci/Ce aumenta de un valor de 25 a pHe 3 a un valor de 35 a pHe 4,5 y luego se mantiene constante.

Con la mayor concentración la relación se mantiene constante e igual a 8,5 entre pHe 3-4 disminuyendo hasta 3,3 para un pHe de 6. En este caso el valor de la entrada de

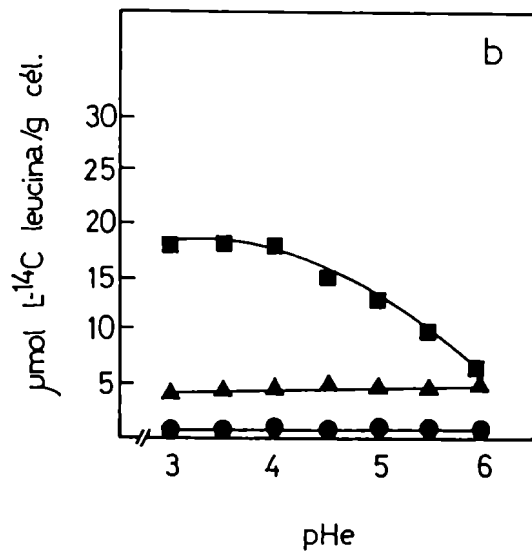
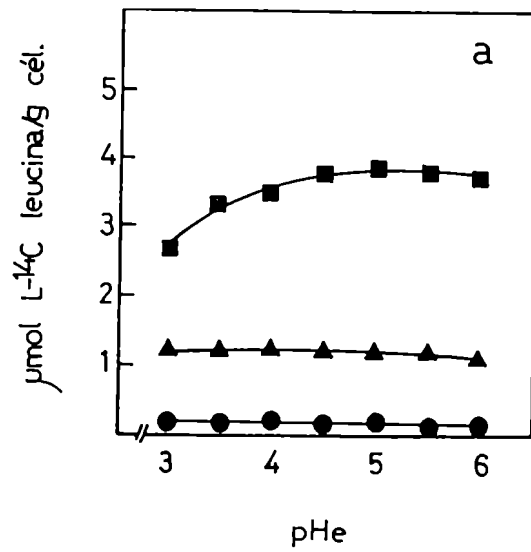


Figura 8.1.: Entrada de L-leucina en la cepa MMY2 crecida en medio Wickerham (\blacktriangle), VJNH_4^+ (\bullet) ó VJPro (\blacksquare).

Células energizadas por preincubación con D-glucosa, resuspendidas en FHK 20 mM a diferentes valores de pHe. L- ^{14}C Leucina externa: 0,05 mM (a); 1,0 mM (b). A los tiempos indicados se tomaron alícuotas que se procesaron para la determinación de la radiactividad intracelular.

L-¹⁴C leucina es del orden del observado a ese mismo pHe en células crecidas en medio Wickerham.

En células de la cepa MMY2/H3, también se observa, figura 8.2., una mayor entrada en el medio VJPro con respecto al medio VJNH₄⁺ y valores intermedios para el medio Wickerham.

Cuando el amonio es la fuente de nitrógeno del medio de cultivo la relación Ci/Ce se mantiene constante para las dos concentraciones y es de 1,6 y 0,4 respectivamente. En células provenientes del medio Wickerham la relación Ci/Ce para la menor concentración, alcanza un máximo de 8,2 a pHe 5 y se mantiene aproximadamente igual a 1,5 a 1,0 mM.

En las células crecidas en el medio VJPro se alcanza un máximo de Ci/Ce 10 a pHe 4 para la menor concentración y un máximo de 2,2 a pHe entre 4 y 4,5 con la otra concentración ensayada.

En la cepa MMY2/LT1/GAP, crecida en medio VJNH₄⁺, figura 8.3., la relación Ci/Ce es de 1,5 a la menor concentración y de 0,2 para la mayor concentración. Al crecer las células en medio Wickerham la relación Ci/Ce disminuye de 25 a pHe 3 a un valor de 0,65 a pHe 6 para la concentración 0,05 mM. Con la mayor concentración, los valores están en el orden de los hallados para células crecidas en VJNH₄⁺.

Los trazados para los valores de entrada en medio VJPro, son similares a los descritos para la cepa MMY2. Cuando se utiliza la menor concentración externa, la relación Ci/Ce se mantiene en el orden de 38 entre pHe 4-6 y para la mayor concentración disminuye de un valor de 11 a pHe 4 a un valor de 5,8.

Cuando la medida de la entrada se realiza en células ayunadas de MMY2 y MMY2/H3 se observa, tabla 8.1., que en las células provenientes del medio Wickerham no hay modificación en sus valores con el pHe. En la cepa MMY2/LT1/GAP para las dos concentraciones externas los valores disminuyen con el pHe.

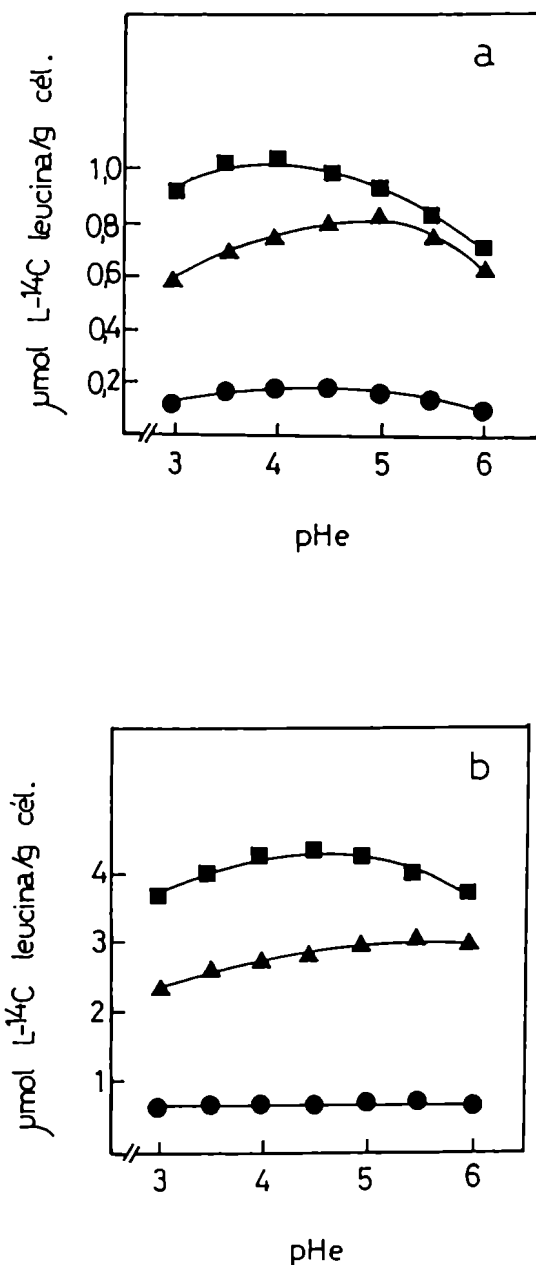


Figura 8.2.: Entrada de L-leucina en la cepa MMY2/H3 crecida en medio wickerham (▲), VJNH₄⁺ (●) ó VJPro (■).

Células energizadas por preincubación con D-glucosa. L-¹⁴C leucina externa: 0,05 mM (a); 1,0 mM (b). A los tiempos indicados se tomaron alícuotas que se procesaron para la determinación de la radiactividad intracelular.

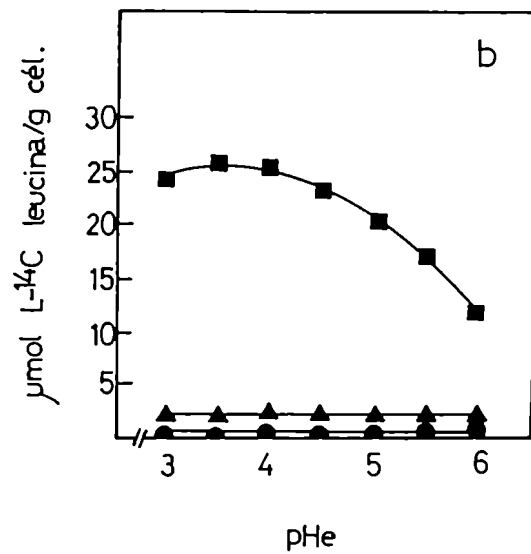
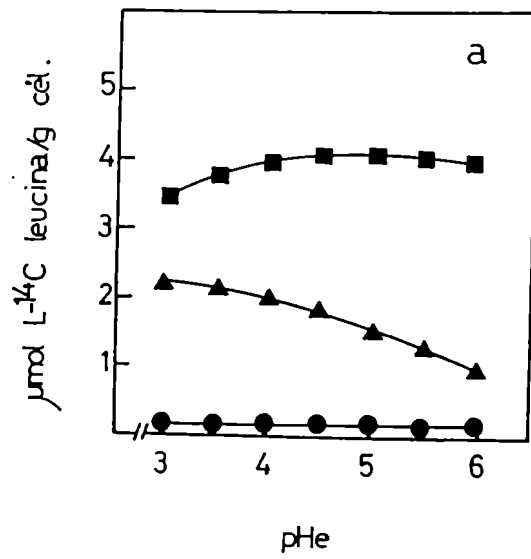


Figura 8.3.: Entrada de L-leucina en la cepa MMY2/LT1/GAP crecida en medio Wickerham (▲), VJNH₄⁺ (●) ó VJPro (■).

Células energizadas por preincubación con D-glucosa. L-¹⁴C leucina externa; 0,05 mM (a); 1,0 mM (b). A los tiempos indicados se tomaron alícuotas que se procesaron para la determinación de la radiactividad intracelular.

Tabla 8.I.: Entrada de L-¹⁴C leucina en células ayunadas.

Cepa	[L-leucina]e (mM)	Medio de cultivo	pH externo		
			3,0	4,5	5,5
MMY2	0,05	Wickerham	0,103 (1,0)	0,098 (1,0)	0,079 (0,8)
MMY2/H3			0,093 (0,9)	0,121 (1,2)	0,124 (1,2)
MMY2/IT1/GAP			0,163 (1,6)	0,093 (0,9)	0,070 (0,7)
MMY2	1,0		0,502 (0,3)	0,446 (0,2)	0,443 (0,2)
MMY2/H3			0,562 (0,3)	0,591 (0,3)	0,583 (0,3)
MMY2/IT1/GAP			0,912 (0,5)	0,756 (0,4)	0,597 (0,3)
MMY2	0,05	VJNH ₄ ⁺	0,116 (1,2)	0,173 (1,7)	0,071 (0,7)
MMY2/H3			0,028 (0,3)	0,048 (0,5)	0,042 (0,4)
MMY2/IT1/GAP			0,039 (0,4)	0,037 (0,4)	0,028 (0,3)
MMY2	1,0		0,345 (0,2)	0,491 (0,3)	0,277 (0,1)
MMY2/H3			0,274 (0,1)	0,326 (0,2)	0,357 (0,2)
MMY2/IT1/GAP			0,271 (0,1)	0,279 (0,1)	0,244 (0,1)
MMY2	0,05	VJPro	3,178 (31,8)	3,270 (32,7)	2,192 (21,9)
MMY2/H3			0,225 (2,3)	0,279 (2,8)	0,299 (2,3)
MMY2/IT1/GAP			3,847 (38,5)	4,154 (41,5)	4,622 (46,2)
MMY2	1,0		9,830 (4,9)	8,384 (4,2)	3,131 (1,6)
MMY2/H3			1,000 (0,5)	1,163 (0,6)	1,122 (0,6)
MMY2/IT1/GAP			18,279 (9,1)	19,284 (9,6)	11,688 (5,8)

Valores en μmol de L-¹⁴C leucina/g. p.s.cél. a T= 3 min.

Entre paréntesis valores de relación Ci/Ce.

En células del medio $VJNH_4^+$ sólo se encuentra una disminución de la entrada en la cepa silvestre a pHe 5,5 para la concentración 0,05 mM. Resultados distintos se encuentran cuando las cepas han crecido en medio VJPro.

En la cepa MMY2, la relación C_i/C_e disminuye al aumentar el pHe, tanto a baja como a alta concentración externa del aminoácido. La relación disminuye de 30 a 22 en el primer caso y de 5 a 1,5 para el segundo caso.

Para la mutante gap MMY2/H3 en cambio, no hay modificación en los valores de entrada con el pHe y los valores son menores que los de la cepa silvestre.

En la cepa MMY2/LT1/GAP la disminución en los valores de entrada es significativa para la mayor concentración externa, pasando de un valor de C_i/C_e 9 a pHe 3 a un valor de 5,8 a pHe 5,5.

8.2. EFECTO DEL PH EXTERNO SOBRE EL PH INTERNO CELULAR. VALOR DEL GRADIENTE DE PROTONES

Como se señaló en Materiales y Métodos, la determinación de la relación de distribución interna/externa del ácido benzoico permite calcular el valor del pH_i de las células de levadura, en las mismas condiciones experimentales que las empleadas para el estudio del transporte del aminoácido. Para la cepa silvestre MMY2 crecida en medio Wickerham se determinaron los valores de C_i/C_e en función del tiempo a diferentes pHe, los resultados se presentan en la figura 8.4.

La relación de distribución C_i/C_e , disminuye con el aumento del pHe, tanto en células ayunadas como en las energizadas, alcanzándose el estado estacionario de la distribución a partir de los 3 min. En las células crecidas en medio $VJNH_4^+$ o VJPro también se encuentra una disminución en los valores de la relación C_i/C_e con el aumento del pHe.

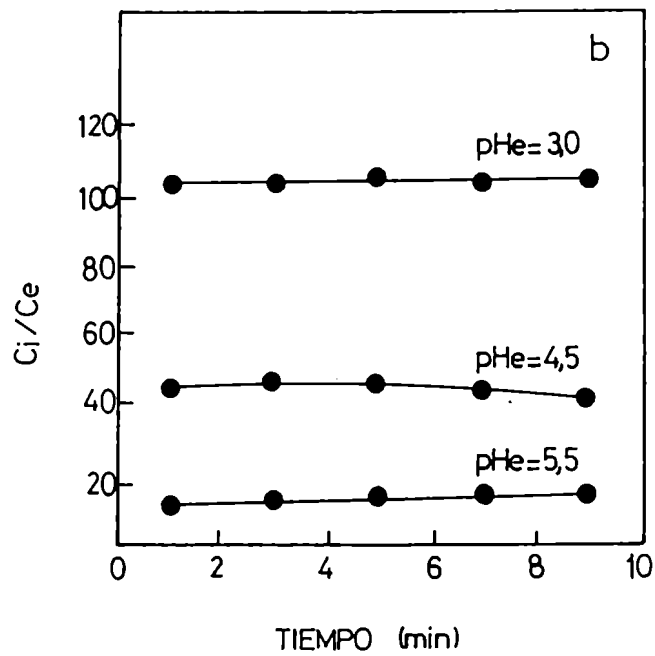
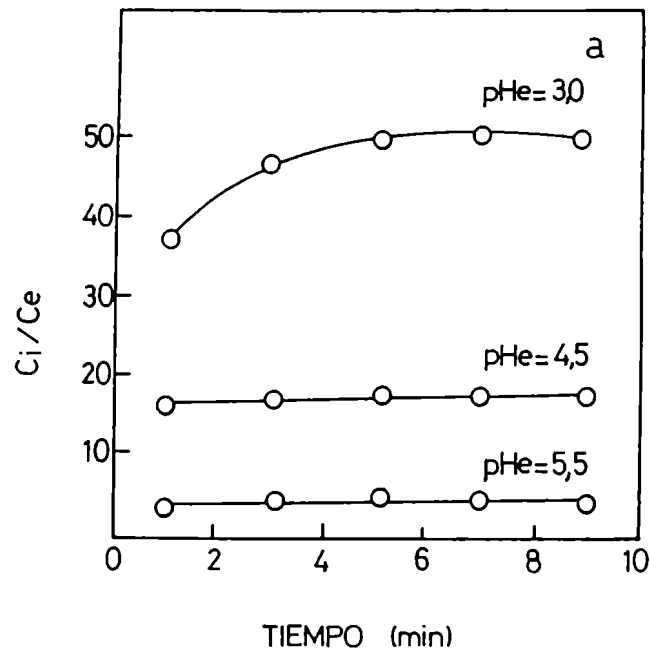


Figura 8.4.: Distribución intra-extracelular de ácido benzoico en la cepa MMY2 crecida en medio Wickerham. Células ayunadas (O) ó energizadas por preincubación con D-glucosa (●).

En base a los valores de C_i/C_e obtenidos a partir del estado estacionario, se calcularon los valores de pH_i en los distintos medios y condiciones ensayadas, tabla 8.II. A partir del valor de pH interno se estima el valor de pH a través de la barrera de permeabilidad.

En todos los medios empleados, la preincubación de las células con glucosa da como resultado un aumento en los valores de pH_i .

En células ayunadas provenientes del medio Wickerham, el pH_i se mantiene aproximadamente constante en las condiciones ensayadas. Para las células crecidas en medio mínimo, hay en cambio un aumento de 0,4 unidades al pasar de un valor de pH_e de 4,5 a 5,5.

Graficando los valores de ΔpH en función del pH_e , figura 8.5., se obtiene una disminución lineal con el aumento del pH_e , con pendientes similares para los tres medios de cultivo empleados, independientemente de la condición energética de la célula.

Resultados similares se obtuvieron con las cepas MMY2/H3 y MMY2/LT1/GAP, tablas 8.III y 8.IV.

Tabla 8.II.: Efecto del medio de cultivo y de la condición metabólica sobre el pH intracelular y el Δ pH de la cepa MMY2.

Medio de cultivo	Condición metabólica	pHe	pHi	Δ pH
Wickerham	Ayunada	3,0	5,92	2,92
		4,5	5,93	1,43
		5,5	6,14	0,64
	Energizada	3,0	6,25	3,25
		4,5	6,33	1,83
		5,5	6,61	1,11
VJNH ₄ ⁺	Ayunada	3,0	5,82	2,82
		4,5	5,62	1,12
		5,5	6,04	0,54
	Energizada	3,0	6,35	3,35
		4,5	6,44	1,94
		5,5	6,74	1,24
VJPro	Ayunada	3,0	6,30	3,30
		4,5	6,17	1,67
		5,5	6,55	1,05
	Energizada	3,0	6,34	3,34
		4,5	6,45	1,95
		5,5	6,83	1,33

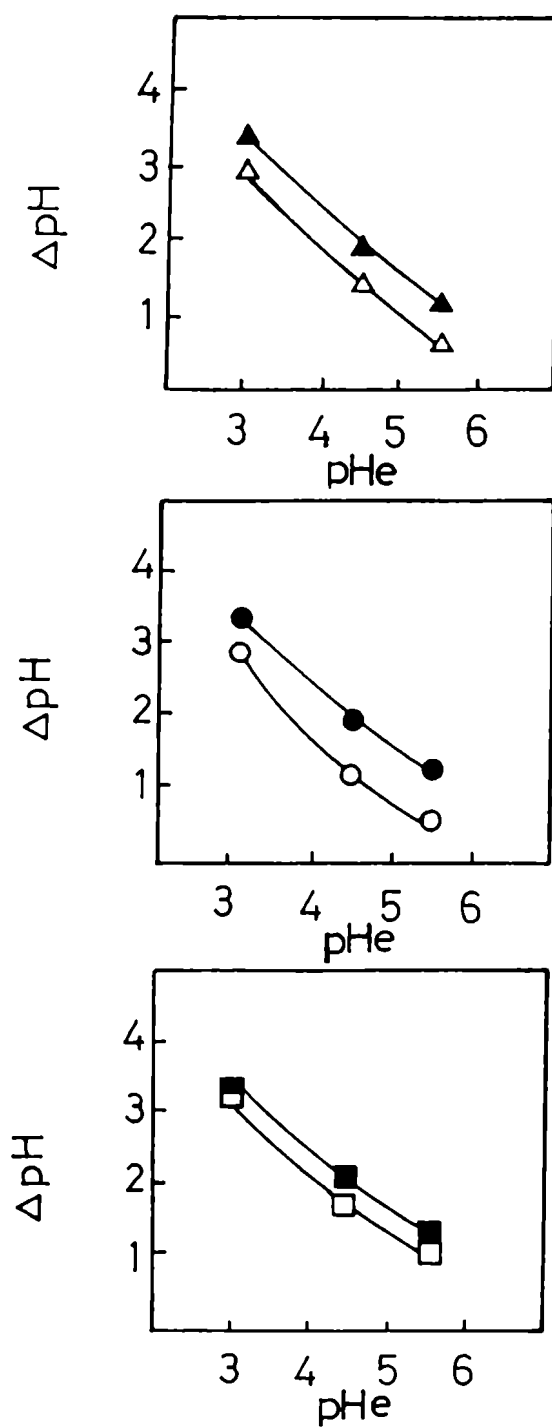


Figura 8.5.: Efecto del pHe sobre el Δ pH de la cepa MMY2 crecida en medio Wickerham (Δ - \blacktriangle), $VJNH_4^+$ (\circ - \bullet) ó $VJPro$ (\square - \blacksquare). Células ayunadas (Δ - \circ - \square) ó energizadas por preincubación con D-glucosa (\blacktriangle - \bullet - \blacksquare).

Tabla 8.III.: Efecto del medio de cultivo y de la condición metabólica sobre el pH intracelular y el Δ pH de la cepa MMY2/H3.

Medio de cultivo	Condición metabólica	pHe	pHi	Δ pH
Wickerham	Ayunada	3,0	6,04	3,04
		4,5	6,14	1,64
		5,5	6,35	0,85
	Energizada	3,0	6,15	3,15
		4,5	6,29	1,79
		5,5	6,60	1,10
VJNH ₄ ⁺	Ayunada	3,0	5,94	2,94
		4,5	5,85	1,35
		5,5	5,90	0,40
	Energizada	3,0	6,10	3,10
		4,5	6,23	1,73
		5,5	6,40	0,90
VJPro	Ayunada	3,0	6,40	3,40
		4,5	6,20	1,70
		5,5	6,51	1,01
	Energizada	3,0	6,38	3,38
		4,5	6,45	1,95
		5,5	6,90	1,40

Tabla 8.IV.: Efecto del medio de cultivo y de la condición metabólica sobre el pH intracelular y el Δ pH de la cepa MMY2/LT1/GAP.

Medio de cultivo	Condición metabólica	pHe	pHi	Δ pH
Wickerham	Ayunada	3,0	6,13	3,13
		4,5	6,23	1,73
		5,5	6,42	0,92
	Energizada	3,0	6,23	3,23
		4,5	6,39	1,89
		5,5	6,67	1,17
VJNH ₄ ⁺	Ayunada	3,0	5,78	2,78
		4,5	5,51	1,01
		5,5	5,95	0,45
	Energizada	3,0	6,07	3,07
		4,5	6,31	1,81
		5,5	6,63	1,13
VJPro	Ayunada	3,0	6,60	3,60
		4,5	6,25	1,75
		5,5	6,54	1,04
	Energizada	3,0	6,67	3,67
		4,5	6,61	2,11
		5,5	6,98	1,48

DISCUSSION

REGULACION DE LA ACTIVIDAD DE LOS SISTEMAS TRANSPORTADORES
POR LA FUENTE DE NITROGENO DEL MEDIO DE CULTIVO.

Las células de los microorganismos tienen una capacidad limitada para controlar las propiedades de su medio externo. Por lo tanto deben desarrollar mecanismos que le permitan ofrecer las respuestas más convenientes ante cambios en el medio en que viven. En principio esto puede ocurrir de dos formas: por cambios en su información genética, o por una adaptación fenotípica. Los cambios genéticos resultan de mutaciones espontáneas durante el proceso de reproducción y pertenecen entonces a una potencialidad natural de la célula. Las adaptaciones fenotípicas, sin embargo, están influenciadas por las condiciones del medio (131).

Las células deben disponer de nutrientes que requieren para el mantenimiento de sus funciones fisiológicas. Entre los nutrientes, los compuestos nitrogenados y en especial los aminoácidos, constituyen un grupo esencial para el metabolismo de las levaduras.

En levaduras del género *Saccharomyces*, resultados previos han demostrado que el transporte del aminoácido L-leucina es mediado por dos sistemas caracterizados cinéticamente. Un sistema S_1 de alta afinidad, K_{T1} y baja velocidad máxima, V_{max1} y otro sistema S_2 de baja afinidad, K_{T2} y alta velocidad máxima, V_{max2} . En *S.cerevisiae* cepa 207 diploide los parámetros cinéticos son $K_{T1} = 0,055$ mM, $V_{max1} = 0,79$ μ mol/g.min, $K_{T2} = 0,92$ mM, $V_{max2} = 2,34$ μ mol/g.min y en *S.cerevisiae* JB65 silvestre diploide $K_{T1} = 0,034$ mM, $V_{max1} = 0,53$ μ mol/g.min, $K_{T2} = 0,41$ mM, $V_{max2} = 1,59$ μ mol/g.min. (76).

Además de la participación de estos sistemas, la L-leucina puede ser transportada por la permeasa general de aminoácidos, GAP (15,53). La existencia de estos tres sistemas decidió el estudio de la participación relativa de los mismos, la contribución parcial en la incorporación total del

aminoácido y la regulación de las actividades de los sistemas, como respuesta a diferentes fuentes de nitrógeno del medio de cultivo. Como condiciones de represión se utilizaron medios con amonio como fuente de nitrógeno y de desrepresión medios con L-prolina, así como medio rico Wickerham (extracto de levadura, extracto de malta, peptona, glucosa).

En células de la cepa JB65 silvestre diploide, crecidas en medio rico Wickerham o suplementado con amonio, la entrada e incorporación de L-leucina, es menor que cuando proviene de un medio suplementado con L-prolina (figura 4.1.). El aumento en este caso es importante con la concentración externa baja, 0,05 mM, en que el proceso es concentrativo.

Este resultado indica que en condiciones de represión de la permeasa general por amonio, la L-leucina es transportada por el sistema S_1 , sin descartar que en estas células haya también una baja actividad de la GAP. En condiciones de desrepresión por L-prolina en el medio de cultivo, puede atribuirse la mayor entrada a la operación conjunta de los sistemas S_1 y GAP.

Es interesante señalar que en células crecidas en medio Wickerham los valores de entrada son similares al medio conteniendo amonio. La presencia de extracto de levadura en los medios $MYNH_4^+$ o MYPro y además de peptona en el medio Wickerham dificulta la interpretación de los resultados debido a que en los medios no hay una única fuente de nitrógeno. Sin embargo, resultados similares se obtienen en células crecidas en medios sintéticos $VJNH_4^+$ o VJPro (figura 4.2.).

Una aproximación cuantitativa del funcionamiento de cada uno de los sistemas de transporte de L-leucina puede inferirse por la inhibición del proceso por el mismo aminoácido o por L-citrulina que inhibe, específicamente el transporte por la GAP (53). Los datos de la tabla 4.II. muestran un efecto competitivo de la L-citrulina sobre

la entrada de L-leucina. El efecto es diferente para las dos concentraciones externas de esta última indicando que para la concentración menor, la GAP contribuye en el transporte del aminoácido.

Por la inhibición observada con L-citrulina, en células crecidas en medio $VJNH_4^+$ no hay una represión total sobre la actividad de la GAP. La inhibición de la incorporación, con la mayor concentración externa de L-leucina, indica que la GAP participa en altas concentraciones, sólo en células desreprimidas.

De los resultados descriptos es posible establecer que: 1, en medios de cultivo con una fuente pobre de nitrógeno, como la L-prolina, la actividad de los sistemas transportadores es mayor y 2, en células crecidas en medios con una fuente rica de nitrógeno, a concentración externa baja operaría otro sistema además del sistema S_1 ,

La cinética de la entrada de L-leucina, en función de las concentraciones externas del aminoácido (figura 4.3) y los datos de los parámetros cinéticos de los sistemas transportadores (tabla 4.I.) demuestran que los sistemas S_1 y S_2 , en condiciones de represión de la GAP por amonio, funcionan con valores de K_T en el orden de los K_{T1} y K_{T2} descriptos previamente en células crecidas en medio Wickerham. Los valores de V_{max} sugieren que en condiciones de represión por amonio, hay un número menor de formas activas del transportador para L-leucina. En el caso de desrepre-sión, los datos indican la existencia de sólo un sistema con un valor de K_T del orden de K_{T1} y V_{max} del orden de V_{max2} .

Estos resultados cinéticos podrían indicar que, en condiciones de desrepresión sólo actúa el sistema de la GAP. Sin embargo, no debe descartarse que estos datos cinéti-cos enmascaren la actividad de sistemas que tengan cons-tantes cinéticas similares.

Como se señaló en los ensayos de competencia con L-ci-trulina, la entrada de L-leucina no es inhibida totalmen-

te, como correspondería a un transporte único a través de la GAP. Por otro lado el sistema S_1 , tiene un K_{T1} similar al de los aminoácidos transportados por la GAP (53).

En el estudio del efecto del amonio sobre los sistemas de transporte de aminoácidos es necesario distinguir el proceso de represión por amonio, contenido en el medio de cultivo y el de inhibición por amonio, en el medio de incubación en que se determina la entrada de L-leucina (33, 53,66).

En células no reprimidas (tabla 4.III.) a baja concentración externa de L-leucina, operan los sistemas S_1 y GAP y el amonio inhibe la entrada de L-leucina por la GAP. Para células reprimidas, en ausencia de la GAP con las dos concentraciones externas de L-leucina, se pone de manifiesto un efecto inhibitorio del amonio sobre los sistemas S_1 y S_2 . Comparando los valores de entrada en ambos casos se encuentra que en células con una activa síntesis de proteínas, por incubación con glucosa y amonio, la actividad de transporte por los sistemas S_1 y S_2 es mayor que en células incubadas sólo con glucosa.

Los resultados expuestos indican que los sistemas S_1 y S_2 no son idénticos a la GAP. En la levadura Saccharomyces cerevisiae JB65 crecidas en medios suplementados con amonio, la entrada de L-leucina es mediada por los sistemas S_1 y S_2 en ausencia de funcionamiento de la GAP.

En estas condiciones, la entrada por los sistemas S_1 y S_2 permite a las células la posibilidad de consumo del aminoácido externo, propiedad que los distingue de las permeasas de L-prolina, que son reprimidas por amonio (82-85). El amonio inhibe en mayor extensión la entrada de L-leucina por la GAP.

Un avance en el conocimiento de la participación de sistemas múltiples en la entrada de nutrientes, ha sido posible por el estudio en cepas silvestres y mutantes de transporte aisladas a partir de las primeras. Para aminoácidos esa metodología ha permitido estudiar los sistemas

para lisina y arginina por Grenson, M. y col. y para L-prolina por Brandriss, M.C.

Los resultados obtenidos en S.cerevisiae JB65 indican la participación de tres sistemas S₁, S₂ y GAP.

La confirmación de la actividad de estos sistemas proviene de los ensayos en la cepa de S.cerevisiae MMY2, silvestre haploide y las mutantes MMY2/H3, MMY2/LT1/GAP y MMY2/H3/LT1.

Las determinaciones de incorporación de L-leucina en células MMY2 y su mutante gap MMY2/H3, crecidas en medio Wickerham indican que para ese medio, la entrada del aminoácido es mediada por sistemas distintos a la GAP, debido a que no se encuentran diferencias en la acumulación por las dos cepas (figura 5.1.).

Como se describió, la utilización de medios sintéticos con una fuente definida de nitrógeno permite realizar ensayos de incorporación en células donde la actividad de la GAP se encuentra reprimida o desreprimida. El efecto de la desrepresión por L-prolina de los sistemas transportadores, queda demostrado por los resultados obtenidos de la incorporación de L-¹⁴C citrulina en la cepa MMY2.

En las condiciones de ensayo usadas (células ayunadas y energizadas por preincubación con glucosa) para el medio VJPro se observa una rápida entrada de L-¹⁴C citrulina (figura 5.8.) que es transportada en forma específica por la GAP. Este aumento en los valores de entrada, con respecto al medio VJNH₄⁺, no se produce en la mutante gap MMY2/H3. El aumento observado en los valores de entrada de L-leucina (figura 5.2.) en la cepa silvestre MMY2, al crecerla en medio con L-prolina en lugar de amonio como fuente de nitrógeno, es similar al aumento en la cepa JB65 (figura 4.2.). La rápida entrada también se produce en las células ayunadas del medio VJPro, principalmente a bajas concentraciones externas del aminoácido.

En las células de la cepa MMY2/H3 no se alcanza la saturación observada en la cepa silvestre (figura 5.3.). La

deficiencia en la actividad de la GAP debido a la mutación que presenta la cepa, permite la operación del sistema S_1 a bajas concentraciones externas del aminoácido. Este sistema por su baja velocidad máxima, no permite la acumulación del aminoácido tan rápidamente como para alcanzar la saturación a T_{0+3} min. En estas células además, la presencia de L-prolina en el medio de cultivo aumenta la incorporación mediada por los sistemas S_1 y S_2 , con respecto al crecimiento en medio con iones amonio como fuente de nitrógeno. El efecto de la L-prolina también se produce en células energizadas de la doble mutante MMY2/H3/LT1, tabla 6.I.

Un aumento en la entrada de los aminoácidos, al usar una fuente pobre de nitrógeno como L-prolina, ha sido usualmente asociada a la operación de la GAP (15).

Sin embargo, para el aminoácido L-serina que no es transportado por la GAP, Prasad, R. y col. (61) encontraron un aumento en los valores de entrada cuando la L-prolina es la fuente de nitrógeno del medio de cultivo. Los resultados comentados señalan que un aumento en la actividad de transporte para un dado aminoácido al utilizar una fuente pobre de nitrógeno, no puede atribuirse solamente a una participación de la GAP en dicho proceso.

Las determinaciones cinéticas y los parámetros calculados para las distintas cepas (tabla 5.I y figuras 5.4.-5.6.) permiten concluir que en la cepa MMY2 crecida en condiciones de desrepresión, el único sistema caracterizado cinéticamente, se debe a una superposición de la actividad de la GAP sobre los sistemas S_1 y S_2 . Este resultado también se encontró en la cepa diploide JB65 (tabla 4.I.). La contribución de la GAP resulta anulada en la mutante MMY2/H3 caracterizándose los sistemas S_1 y S_2 . Los valores de K_T determinados en esta cepa (tabla 5.I.) están en el orden de los obtenidos en otras cepas silvestres (76,130) indicando que el sistema GAP no está relacionado con las entidades responsables de la afinidad de los sistemas S_1 y S_2 . Los sistemas son sensibles a la presencia del amonio en el

medio de cultivo, como se observa por la disminución en los valores de J_{\max} con respecto a los valores encontrados en VJPro, aunque la máxima disminución se produce sobre la GAP.

La cepa MMY2/LT1/GAP tiene disminuída la actividad de los sistemas S_1 y S_2 para el transporte de L-leucina. Los parámetros obtenidos en esta cepa resultan entonces los valores para el transporte de L-leucina por la GAP. La afinidad obtenida está en el orden de la determinada para otros aminoácidos transportados por el sistema general (53). Los valores obtenidos justifican la superposición de actividades observada en cepas silvestres, que dificultan el estudio de la incorporación de un aminoácido, cuando es mediado por la operación de sistemas de especificidad parcial y sistemas de amplia especificidad.

Los resultados de competencia de la entrada de L-leucina por otros aminoácidos permiten conocer la operación relativa de cada sistema en las distintas condiciones experimentales usadas.

En presencia de diferentes aminoácidos (tablas 5.III-5.V.) la entrada de $L-^{14}C$ leucina muestra inhibición para el transporte del aminoácido radiactivo, tanto en la cepa silvestre como en la mutante gap. En la primera cepa el aminoácido α -aminoisobutírico es el único que no inhibe la entrada de L-leucina. En la mutante gap además de este aminoácido, la L-citrulina no produce inhibición. Los resultados obtenidos en los ensayos de competencia son concordantes con los de la cepa JB65, que indican la presencia de más de un sistema de acuerdo a las condiciones ensayadas. La L-citrulina inhibe el aminoácido transportado por la GAP, pero no el que resulta transportado por los sistemas S_1 y S_2 .

En el estudio del efecto de los reactivos de grupos tioles sobre el transporte de L-leucina, Ramos, E.H. y col. encontraron que la incubación previa con el aminoácido, aumenta los valores de entrada con respecto a células ayuna-

das.

Bussey, H. y Umbarger, H.E., demostraron que cuando el aminoácido L-leucina es utilizado como fuente de nitrógeno en lugar de amonio, aumentan tanto los valores de entrada del aminoácido como la capacidad de ligado o unión "binding" a proteínas aisladas de células crecidas en ese medio de cultivo (5).

Resultó interesante por lo tanto, indagar que efecto podía tener la L-leucina sobre la cinética de incorporación, cuando se utiliza como fuente de nitrógeno del medio de cultivo. Los valores de G (tiempo de generación, ver Materials y Métodos) y el tiempo necesario para alcanzar la fase estacionaria de crecimiento, demuestran que la L-leucina comparada con el amonio, no es una buena fuente de nitrógeno. Como se deduce de la curva de crecimiento de la cepa mutante gap, MMY2/H3, la actividad de los sistemas S_1 y S_2 es suficiente para permitir el crecimiento de las células en forma similar a la cepa silvestre. Otro dato que confirma que la L-leucina es transportada por la GAP es la capacidad de la mutante MMY2/LT1/GAP para crecer en el medio VJLeu. Los resultados presentados (figuras 5.7.-5.11 y tabla 5.II) indican que el aumento en los valores de entrada de L-leucina en la cepa silvestre, se debe a la desrepre^sión de la GAP por el aminoácido, cuando es utilizado como fuente de nitrógeno del medio de cultivo. Desde un punto de vista cinético, la L-leucina tiene un efecto similar a la L-prolina sobre la actividad de la GAP. No puede descartarse que además, la L-leucina tenga efecto sobre la actividad o síntesis de proteínas de ligado involucradas en el proceso de transporte (11).

Es interesante señalar que en la cepa MMY2, la sensibilidad al aminoácido D-histidina transportado por la GAP y que es tóxico para el metabolismo celular, disminuye al utilizar L-leucina en lugar de L-prolina como fuente de nitrógeno (Kotliar, N. comunicación personal).

La TFL es un compuesto de estructura análoga a la L-leucina y ha sido empleada para aislar mutantes deficientes en el metabolismo del aminoácido (5).

La cepa MMY2/H3/LT1, aislada por su resistencia a TFL, presenta una baja actividad para el transporte del aminoácido de acuerdo a los valores de entrada en células crecidas en medio Wickerham (figura 6.1.). Para estas células el transporte no es concentrativo, a diferencia de lo que ocurre en la cepa MMY2 y en la cepa parental MMY2/H3 (figura 5.1.).

Las determinaciones cinéticas permiten caracterizar en la cepa, un solo sistema para el transporte del aminoácido. El sistema tiene baja afinidad y baja velocidad máxima (tablas 6.I. y 6.II). La característica del sistema impide que la TFL sea transportada al interior celular y resulte tóxica para el crecimiento. Como ha sido señalado, la utilización de L-prolina como fuente de nitrógeno, aumenta los valores de entrada de L-leucina. La mutación no altera la utilización de la L-prolina ni el efecto de esta fuente de nitrógeno sobre la actividad de los sistemas transportadores.

El cruce de esta mutante con la cepa silvestre D-28, permitió obtener tetradas en las cuales se estudió la cinética de incorporación. Las determinaciones cinéticas muestran diferencias con respecto a la actividad de transporte de cada tetrada. En una tetrada, dos miembros tienen deficiencias para el transporte del aminoácido y en la otra, sólo una no lo transporta (tabla 6.II.). Otra de las características es que las cepas presentan uno o dos sistemas de transporte. Teniendo en cuenta estos resultados, no puede asegurarse que la mutación de un solo gen sea responsable de la baja actividad de la cepa MMY2/H3/LT1. En base a lo observado en la cepa silvestre MMY2 al crecer en medio VJPro, la cinética de la cepa MMY2/H3/LT1 podría ser el resultado de la operación simultánea de sistemas

con baja actividad, ya sea por disminución de la J_{max} o por pérdida de la afinidad.

La actividad relativa de los sistemas S_1 , S_2 y GAP depende de la fuente de nitrógeno del medio de cultivo y por lo menos tres mutaciones afectan la cinética de incorporación del aminoácido.

TRANSPORTE DE L-LEUCINA EN MUTANTES DEFICIENTES RESPIRATORIAS

En el estudio de los requerimientos energéticos para la incorporación de L-leucina en S.cerevisiae, Ramos, E. H. y col. (48) encontraron que los sustratos capaces de activar la transferencia de electrones en mitocondria y la fosforilación oxidativa, estimulan el transporte y la acumulación del aminoácido. Los resultados obtenidos con cepas silvestres y deficientes respiratorias ρ^- , indicaron que en células competentes respiratorias, la mitocondria contribuye aportando compuestos de alta energía requeridos en el proceso de transporte.

Con el objeto de ampliar estos resultados, se decidió utilizar cepas deficientes respiratorias obtenidas a partir de la cepa diploide JB65 y de la haploide MMY2/H3 (ver Materiales y Métodos). En estas cepas parentales, como se describió, la actividad de los sistemas de transporte de L-leucina depende de la fuente de nitrógeno del medio de cultivo.

En la preparación de mutantes deficientes respiratorias, el BrEt presente en el medio de cultivo produce deleciones en el ADN mitocondrial. Entre los genes mitocondriales se encuentran los de componentes de la cadena respiratoria, así como de subunidades de la ATPasa mitocondrial (132).

La membrana interna mitocondrial carece entonces de componentes que incluyen a los citocromos aa₃ y b de la cadena respiratoria. Debido a esto, las mutantes no consumen oxígeno y su crecimiento está sostenido por la glucólisis citosólica como fuente de ATP (133,134). Para las mutantes rho⁻ además de la deficiencia respiratoria, se han descrito diferencias con respecto a las cepas silvestres, en las características de la superficie celular (135-137) y en la utilización de algunos azúcares como D-galactosa y D-maltosa.

Las determinaciones de entrada de L-leucina en mitocondrias aisladas de la cepa MMY2 (ver punto 5.5.) indican que en las condiciones de crecimiento utilizadas, no represión catabólica, las organelas son aptas para transportar el aminoácido. Teniendo en cuenta una relación 2:1 para p.s.cél/proteína y que la mitocondria representa el 10 por ciento del peso de la célula, puede estimarse un flujo de 0,07 $\mu\text{mol/g}\cdot\text{min}$ para una concentración externa 1,0 mM. El valor calculado es 15 veces menor que el determinado para igual concentración externa de aminoácido, a través de la barrera de permeabilidad celular (76,138). En condiciones fisiológicas, el valor en cepas silvestres probablemente disminuya por competencia con otros aminoácidos o metabolitos y en deficientes respiratorias sería menor, debido a la incapacidad de las mitocondrias para sintetizar proteínas (134). El transporte al interior mitocondrial no produce diferencias en los valores de entrada del aminoácido entre las cepas parentales y deficientes respiratorias.

En las cepas deficientes respiratorias JB65 rho⁻₁, JB65 rho⁻₂ y JB65 rho⁻₃, los valores de entrada e incorporación medidos difieren para cada cepa (figura 7.1.). En la cepa JB65 rho⁻₁ la entrada no es concentrativa para niguna de las concentraciones externas ensayadas, mientras que en las dos restantes hay acumulación del aminoácido. Los valores determinados para los parámetros cinéticos (tabla 7.I.) muestran una disminución en la velocidad máxi

ma con respecto a la cepa silvestres (tabla 4.I.).

En base a las diferencias encontradas para la actividad de transporte, se decidió evaluar y compara en las tres cepas la salida de protones por agregado de glucosa y el Δ pH a través de la barrera de permeabilidad.

En células de levadura, el proceso de acidificación del medio externo se asocia con el transporte de nutrientes como hidratos de carbono y aminoácidos.

Una evidencia de la relación entre los dos procesos fue presentada por Serrano, R. y col. con mutantes termosensibles para la salida de protones estimulada por glucosa (139). En mutantes que no acidifican el medio externo debido a una baja actividad de la H^+ -ATPasa, no hay transporte de L-leucina o histidina. La actividad de transporte se reestablece al volver a la temperatura en que la H^+ -ATPasa acidifica el medio.

En nuestras cepas no se encontró diferencias en la salida de protones entre las cepas deficientes respiratorias y tampoco con respecto a la cepa silvestre JB65 (tabla 7.II). Otra cepa deficiente, la 207 rho⁻, mostró valores de salida de protones en el orden de las cepas comentadas (48, 124).

La medida de la distribución intra-extracelular de ácido benzoico permite calcular el valor del pHi de las levaduras en las mismas condiciones utilizadas para estudiar el transporte del aminoácido.

En forma análoga a lo observado con la salida de protones, en las tres mutantes, se establece un Δ pH de magnitud similar a la cepa silvestre (tabla 7.III).

Los resultados hasta aquí presentados indican que en estas mutantes desde el punto de vista energético, el aporte a través de la vía glucolítica le permite a la célula mantener un gradiente de pH (Δ pH) a través de la barrera de permeabilidad, termodinámicamente suficiente para impulsar el transporte concentrativo de nutrientes.

En el caso de la cepa JB65 rho⁻₁, la salida de protones

y un ΔpH apropiado no son condiciones suficientes para asegurar el transporte del aminoácido.

Para las otras dos cepas, JB65 rho⁻₂ y JB65 rho⁻₃, la participación del ΔpH en el proceso de transporte puede inferirse indirectamente de la inhibición producida por el DNP (tablas 7.IV y 7.V.) sobre la entrada del aminoácido.

En estas cepas el reactivo disminuye el ΔpH en 0,10 unidades y en un 50 por ciento los valores de entrada, tanto para el sistema S₁ como para el S₂.

Para el DNP además del efecto de transportar protones extracelulares, también se ha descrito su capacidad para permanecer unido a componentes de la membrana (140). Como consecuencia no sólo disminuiría el ΔpH sino que afectaría el ligado del aminoácido a las entidades responsables del reconocimiento.

En el caso de la cepa JB65 rho⁻₁, esto explicaría porque el DNP inhibe los valores aunque la levadura no acumula el aminoácido (tabla 7.IV).

Como forma de evaluar la actividad de otro sistema impulsado por un gradiente de iones, se puede relacionar la capacidad para crecer de cepas silvestres y deficientes respiratorias en medios con maltosa como fuente de carbono. Durante el transporte de maltosa en levaduras, un protón es cotransportado con cada mol de carbohidrato (24, 104).

La reducción en los niveles intracelulares de ATP por la acción combinada de antimicina y 2-desoxiglucosa tiene poco efecto sobre el transporte del azúcar, mientras que el DNP lo inhibe, sugiriendo la participación del gradiente de protones. En deficientes respiratorias, Wilkie, D. y col. han descrito diferencias en la utilización de galactosa o maltosa como fuente de carbono con respecto a las cepas parentales (136,137). La capacidad para utilizar el carbohidrato se restablece luego de tratar las deficientes con dimetilsulfóxido (DMSO). Debido a que el reac-

tivo tiene efecto sobre la membrana plasmática, modificando su permeabilidad, se concluyó que la no utilización del compuesto como fuente de carbono, es una consecuencia de la incapacidad para transportarlo a través de la barrera de permeabilidad (136,137).

En la cepa JB65 hay crecimiento con maltosa como fuente de carbono, a diferencia de lo que ocurre con las tres mutantes respiratorias obtenidas a partir de ella. Otra cepa la 207 rho⁻, crece con maltosa como fuente de carbono.

Esta cepa fue utilizada por Ramos, E.H. y col. para estudiar los requerimientos energéticos para el transporte de L-leucina (48), el efecto de los reactivos de grupos tioles (90) así como el efecto de protonóforos sobre el pH_i y la incorporación del aminoácido (124). Si bien es cierto que la entrada del aminoácido es menor (48) que la correspondiente a su cepa parental 207, los valores determinados indican que esta cepa realiza el transporte concentrativo del aminoácido. Comparando las características de las cepas 207 rho⁻ y JB65 rho⁻, podría considerarse que las deficiencias en la segunda cepa, se deben a modificaciones en la barrera de permeabilidad, que impiden el acople o interacción del sistema de transporte con el gradiente electroquímico de protones.

La función de la mitocondria en el proceso de transporte de L-leucina por los sistemas S₁ y S₂, involucraría la participación a nivel del metabolismo y a nivel estructural.

En el primer caso la mitocondria aporta compuestos de alta energía como lo confirman los experimentos en que la estimulación producida por el etanol en la cepa MMY2/H3, resulta anulada en la cepa MMY2/H3 rho⁻₄ (figuras 7.3. y 7.4.). En el segundo caso la mitocondria afecta la funcionalidad de la barrera de permeabilidad impidiendo que los sistemas actúen en forma eficiente.

RELACION ENTRE EL GRADIENTE DE PROTONES Y LA ACTIVIDAD DE LOS SISTEMAS S₁, S₂ Y GAP.

Una característica común de todas las células es su capacidad para mantener el pH citoplasmático aproximadamente constante. Los valores de pH citoplasmático y del interior de organelas son factores importantes que controlan diversos procesos celulares.

En el estudio de las variables que controlan el crecimiento de S.cerevisiae, se encuentra que una disminución en la actividad de la H⁺-ATPasa se correlaciona con una disminución en la velocidad de crecimiento y en los valores de pH citoplasmático (108,109).

El valor del pH citoplasmático (pHi) está relacionado con la magnitud del $\Delta \bar{\mu}_H^+$ a través de la barrera de permeabilidad que tiene un papel central en el transporte de nutrientes.

Los resultados comentados indican, que para el transporte del aminoácido L-leucina participa además de los sistemas S₁ y S₂, el sistema de la permeasa general de aminoácidos, GAP. Teniendo en cuenta entonces la participación de tres sistemas, resulta importante establecer la relación entre el Δ pH a través de la barrera de permeabilidad y la incorporación del aminoácido a través de cada sistema.

Diferentes técnicas han sido utilizadas para la determinación de los valores de pHi en células crecidas en medios de composición química no definida.

En células de diferentes especies de levadura, crecidas en medios con extracto de levadura y glucosa, Slavík, J. y col. determinaron los valores de pHi utilizando compuestos fluorescentes (113). En las cinco levaduras usadas en ese trabajo se obtienen valores de pHi del orden de 5,8 unidades a pHe 3 que aumentan a 6,3 a pHe 6.

Utilizando la técnica de resonancia magnética nuclear de ³¹P (141) se obtienen valores mayores de pHi (7,2 uni-

dades) que se mantienen constantes entre valores de pHe que varían de 6 a 7,9.

Con el método de distribución del ácido propiónico, en células crecidas en medio YPD, de la peña y col. observaron una disminución en la relación C_i/C_e al aumentar el pHe (115). Las relaciones de distribución medidas permiten calcular un pH_i 6,2 a pHe 4,5 que aumenta a 6,6 a pHe 6. En este trabajo también se establece una disminución de tipo lineal del ΔpH al aumentar el pHe.

Los resultados presentados en el punto 8.2. en células crecidas en medio Wickerham, indican un comportamiento similar en los valores de pH_i . Además los valores de pH_i y ΔpH son mayores en células preincubadas con glucosa (tablas 8.II-IV).

En células energizadas crecidas en medios sintéticos con amonio o L-prolina como fuente de nitrógeno, el pH_i y el ΔpH son similares a los valores medidos en células provenientes del medio Wickerham. El pH_i y el ΔpH resultan por lo tanto del mismo orden al preincubar las levaduras con glucosa, independientemente del medio de cultivo utilizado (tablas 8.II-IV).

Se encuentran diferencias en cambio, al comparar los valores en las células crecidas en distintos medios y ayudadas.

En las provenientes del medio $VJNH_4^+$, los valores de pH_i están por debajo de los obtenidos en medio Wickerham. Los máximos valores corresponden a las células crecidas en medio VJPro. En condiciones similares se estudió el transporte del aminoácido.

Los ensayos de entrada para la cepa silvestre MMY2 muestran una disminución de ésta al aumentar el pHe cuando la levadura crece en medio VJPro y se ensaya con una concentración externa de L-leucina igual a 1,0 mM (figura 8.1. y tabla 8.I.). El medio con L-prolina desreprime la actividad de la permeasa general y también aumenta la actividad de los sistemas S_1 y S_2 .

La cepa MMY2/H3 carece de una permeasa general funcional y el transporte del aminoácido se realiza sólo por los sistemas S_1 y S_2 . Si se comparan los resultados obtenidos con estas dos cepas (figuras 8.1. y 8.2. y tabla 8.I.) se encuentra que la relación con el pHe no se conserva al introducir una mutación que afecta la actividad de la permeasa general.

En la cepa MMY2/LT1/GAP el transporte del aminoácido se realiza principalmente a través del sistema general. En esta cepa además del efecto descrito en la cepa silvestre, hay una disminución en la entrada al aumentar el pHe en las células crecidas en medio rico, con baja concentración de L-leucina externa, 0,05 mM (figura 8.3.). En las determinaciones realizadas se encuentra que la relación C_i/C_e para el aminoácido es mayor a baja concentración externa que a alta concentración. Cuando opera el sistema general las relaciones C_i/C_e son mayores que cuando funcionan solamente los sistemas S_1 y S_2 .

Considerando la disminución del ΔpH al aumentar el pHe puede concluirse que el sistema general GAP, resulta más sensible a la magnitud del ΔpH , en las células crecidas en condiciones que permiten su desrepresión. Además del ΔpH la diferencia de potencial eléctrico de membrana, $\Delta \Psi$, contribuye al gradiente electroquímico de protones, $\Delta \tilde{\mu}_H^+$ a través de la membrana plasmática.

En células de levadura no se ha encontrado aún un método adecuado para determinar el valor del $\Delta \Psi$. La mayor parte de las células de levadura son pequeñas para utilizar procedimientos directos que involucren microelectrodos y entonces deben emplearse métodos indirectos. Los procedimientos basados en cambios de fluorescencia de suspensiones de levadura en equilibrio con colorantes derivados de cianina, dan resultados cualitativos (142). Además los colorantes pueden censar potenciales de organelas intracelulares como las mitocondrias o inducir el crecimiento de deficientes respiratorias (143).

Los cationes lipofílicos en algunos casos son transportados por sistemas específicos o pueden unirse a componentes intracelulares llevando a estimaciones erróneas de la distribución entre el citoplasma y el medio externo (111, 112). Las células de levadura Endomyces magnusii son lo suficientemente grandes para medir potenciales de membrana con microelectrodos (144). La característica de esta célula permite calcular y comparar los valores de potencial de terminados con electrodos o cationes lipofílicos.

Los valores calculados con la distribución del catión lipofílico tetrafenilfosfonio (TPP^+) son de -65 mV a pH 4,5 y -125 mV a pH 7. En iguales condiciones los valores hallados con microelectrodos son de -190 mV a pH 4,5 y -275 mV a pH 7,1. En base a estos resultados, estimaciones como las realizadas por Horák, J. y Kotyk, A. para el transporte de L-prolina, no serían exactos (145). Los autores asumiendo una estequiometría 1:1 entre aminoácido/protón, calculan a partir de la distribución de TPP^+ una relación de concentración interna a externa igual a 270 a pHe 4,5 y 75 a pHe 6,6. Las relaciones teóricas están por encima de los valores experimentales obtenidos.

Desde el punto de vista cualitativo sin embargo, los datos de distribución de cationes lipofílicos y la determinación del pH_i de las levaduras, indican que la energía acumulada en el gradiente electroquímico de protones, $\Delta \tilde{\mu}_H^+$ es superior a la requerida para mantener las relaciones de concentración intra-extracelular determinadas. El gradiente electroquímico podría tener otras funciones como por ejemplo mantener en una configuración apropiada a los sistemas de transporte (146).

CONCLUSIONES

En células de Saccharomyces cerevisiae el transporte de L-leucina es mediado por la operación de tres sistemas: S_1 , S_2 y la permeasa general de aminoácidos, GAP.

El sistema S_1 es de alta afinidad, baja velocidad máxima y actúa a concentraciones externas de L-leucina 0,05-0,10 mM y el sistema S_2 de baja afinidad, alta velocidad máxima a concentraciones externas 1,0 mM.

1. En cepas silvestres, la actividad de los sistemas transportadores de L-leucina es máxima en células crecidas en medios conteniendo una fuente pobre de nitrógeno como L-prolina o L-leucina.
2. En medios de cultivo conteniendo iones amonio, la actividad del sistema general resulta reprimida y el transporte se realiza a través de los sistemas S_1 y S_2 . La afinidad de estos sistemas ($K_{T1} = 0,034$ mM y $K_{T2} = 0,410$ mM) no se modifica por la fuente de nitrógeno del medio de cultivo, mientras que los valores de J_{max1} y J_{max2} disminuyen en presencia del amonio.
3. En condiciones que permiten la desrepresión del sistema general, los tres sistemas operan simultáneamente para el transporte de L-leucina, caracterizándose cinéticamente un solo sistema de transporte, de alta afinidad ($K_T = 0,08$ mM) y alta J_{max} ($J_{max} = 8,39$ μ mol/g. min).
4. La preincubación con glucosa e iones amonio, de células crecidas en medio de cultivo de composición química no definida, reprime la actividad del sistema general y aumenta la actividad de transporte de los sistemas S_1 y S_2 .
5. La presencia de iones amonio en el medio de incubación inhibe la entrada de L-leucina por el sistema general.
6. La L-citrulina inhibe el transporte por el sistema gene

- ral, pero no la entrada mediada por los sistemas S_1 y S_2 .
7. La energización de las células por preincubación con glucosa, aumenta la actividad de los sistemas S_1 y S_2 . Para el sistema general sólo hay efecto con la concentración externa 1,0 mM. A baja concentración, 0,05 mM, no hay diferencia en la acumulación observada por células ayunadas o energizadas.
 8. En la mutante MMY2/H3 gap, la actividad de los sistemas S_1 y S_2 es suficiente para sostener el crecimiento en medios con L-leucina como fuente de nitrógeno, $G = 362$ min. La mutación no modifica la afinidad de los sistemas S_1 y S_2 con respecto a las cepas parentales, ni la sensibilidad de los sistemas a la fuente de nitrógeno del medio de cultivo.
 9. En la cepa MMY2/H3/LT1, por lo menos tres mutaciones afectan la cinética de entrada e incorporación del aminoácido. El único sistema que puede caracterizarse cinéticamente presenta baja afinidad ($K_T = 0,21$ mM) y baja velocidad máxima ($J_{max} = 0,20$ μ mol/g. min).
 10. La cepa revertante MMY2/LT1/GAP, en que sólo opera el sistema general para el transporte de L-leucina, puede crecer en medios con L-leucina como fuente de nitrógeno con un valor de $G = 382$ min, similar a la cepa silvestre MMY2, $G = 317$ min. En la revertante, en condiciones de desrepresión, se caracteriza un solo sistema de alta afinidad ($K_T = 0,05$ mM) y alta velocidad máxima ($J_{max} = 5,58$ μ mol/g. min).
 11. En las cepas deficientes respiratorias JB65 rho⁻ la salida de protones y el Δ pH del mismo orden que en la cepa parental, no son condiciones suficientes que aseguren el transporte del aminoácido. La mutación disminuye

además los valores de J_{\max} de los sistemas S_1 y S_2 con respecto a la cepa JB65.

12. En la mutante MMY2/H3, la preincubación con etanol aumenta la actividad de transporte de los sistemas S_1 y S_2 . Sin embargo, este efecto no se observa en la doble mutante MMY2/H3 rho⁻.
13. En células energizadas, el pH intracelular y el Δ pH no dependen del medio de cultivo en que crecieron las células y el Δ pH disminuye con el aumento de los valores de pH externo.
14. La actividad del sistema general en condiciones de desrepresión, es sensible al Δ pH a través de la barrera de permeabilidad.

Stella

Lucy

REFERENCIAS

1. Vella, F. *Biochem.Educ.* (1989) 17, 6.
2. Koshland, D.E. *Science* (1988) 240, 1385.
3. Horecker, B.L. en *Biochemistry and Genetics of Yeast* (1978) (Bacila, M., Horecker, B.L. and Stoppani, A.O. M. editores) Academic Press, New York. pág. 1.
4. Cabib, E. and Roberts, R. *Ann.Rev.Biochem.* (1982) 51, 763.
5. Bussey, H. and Umbarger, H.E. *J.Bacteriol.* (1970) 103, 277.
6. Schwencke, J., Farías, G. and Rojas, M. *J.Biochem.* (1971) 21, 137.
7. Voříšek, J. *Biochim.Biophys.Acta* (1972) 290, 256.
8. Arnold, W.N. *J.Bacteriol.* (1972) 112, 1346.
9. Opekarová, M., Kotyk, A., Horák, J. and Kolodenko, V.P. *Eur.J.Biochem.* (1975) 59, 373.
10. Woodward, J.R. and Kornberg, H.L. *Biochem.J.* (1980) 192, 659.
11. Wainer, S.R., Boveris, A. and Ramos, E.H. *Arch.Biochem. Biophys.* (1988) 262, 481.
12. Kováč, L. *Biochim.Biophys.Acta* (1974) 346, 101.
13. Sulo, P., Griač, P., Klobučniková, V. and Kováč, L. *Curr.Genet.* (1989) 15, 1.
14. Wiemken, A. and Durr, M. *Arch.Microbiol.* (1974) 101, 45.
15. Wiame, J., Grenson, M. and Herbert, N.A. *Adv.Microbiol. Physiol.* (1985) 26, 2.
16. Veenhuis, M., Mateblowski, M., Kunau, W.H. and Harder, W. *Yeast* (1987) 3, 77.
17. Botstein, D. and Fink, G.R. *Science* (1988) 240, 1439.
18. Cooper, T.G. en *The Molecular Biology of the Yeast Saccharomyces. Metabolism and Gene Expression* (1982)

(Strathern, J.N., Jones, E.W. and Broach, J.R. editores)
Cold Spring Harbor Laboratory, pág. 399.

19. Cirillo, V.P. J.Bacteriol. (1962) 84, 485.
20. Cirillo, V.P. J.Bacteriol. (1968) 95, 603.
21. Cirillo, V.P. J.Bacteriol. (1968) 95, 1727.
22. Kou, S.C., Christensen, M.S. and Cirillo, V.P. J.Bacteriol. (1970) 103, 671.
23. Kou, S.C. and Cirillo, V.P. J.Bacteriol. (1970) 103, 679.
24. Serrano, R. Eur.J.Biochem. (1977) 80, 97.
25. Horák, J. Biochim.Biophys.Acta (1986) 864, 223.
26. Grenson, M. Eur.J.Biochem. (1969) 11, 249.
27. Polak, A. and Grenson, M. Eur.J.Biochem. (1973) 32, 276.
28. Parlebas, N. and Chevallier, M.R. FEBS Lett. (1976) 65, 327.
29. Sols, A., Gancedo, C. and DelaFuente, G. en The Yeast (1971) (Rose, A.H. and Harrison, J.S. editores) Academic Press. London and New York. pág. 271.
30. Roon, R.J., Even, H.L., Dunlop, R. and Larimore, F.S. J.Bacteriol. (1975) 122, 502.
31. Dunlop, R., Roon, R.J. and Even, H.L. J.Bacteriol (1976) 125, 999.
32. Roon, R.J., Meyer, G.M. and Larimore, F.S. Mol.Gen.Genet. (1977) 158, 185.
33. Roon, R.J., Levy, J.S. and Larimore, F.S. J.Biol.Chem. (1977) 252, 3599.
34. Iwashima, A., Nichino, H. and Nose, Y. Biochim.Biophys. Acta (1973) 330, 222.
35. Iwashima, A. and Nose, Y. J.Bacteriol. (1976) 128, 855.
36. Iwashima, A., Nishimura, H. and Nose, Y. Biochim.

- Biophys.Acta (1979) 557, 460.
37. Rogers, T.O. and Lichstein, H.C. J.Bacteriol. (1969) 100, 557.
 38. Rogers, T.O. and Lichstein, H.C. J.Bacteriol. (1969) 100, 565.
 39. Perl, M., Kearney, E.B. and Singer, T.P. J.Biol.Chem. (1976) 251, 3221.
 40. Nikawa, J.I., Nagumo, T. and Yamashita, S. J.Bacteriol. (1982) 150, 441.
 41. Hosaka, K. and Yamashita, S. J.Bacteriol. (1980) 143, 176.
 42. Borst-Pauwels, G.W.F.H. and Peters, P.J.H. Biochim. Biophys.Acta (1977) 466, 488.
 43. Roomans, G.M. and Borst-Pauwels, G.W.F.H. Biochim. Biophys.Acta (1977) 470, 84.
 44. Breton, A. and Surdin, Y. J.Bacteriol. (1977) 132, 224.
 45. Roomans, G.M., Theuvenet, A.P.R., Van Den Berg, T.P.R. and Borst-Pauwels, G.W.F.H. Biochim.Biophys.Acta (1979) 551, 187.
 46. Ramos, J., Contreras, P. and Rodríguez Navarro, A. Arch. Microbiol. (1985) 143, 88.
 47. Dubois, E. and Grenson, M. Mol.Gen.Genet. (1979) 175, 67.
 48. Ramos, E.H., Bongioanni, L.C. de, Claisse, M.L. and Stoppani, A.O.M. Biochim.Biophys.Acta (1975) 394, 470.
 49. Eddy, A.A. Adv.Microbiol.Physiol. (1982) 23, 1.
 50. Surdin, Y., Sly, W., Sire, J., Bordes, A.M. and De Robichon-Szulmajster, H. Biochim.Biophys.Acta (1965) 107, 546.
 51. Halvorson, H.O. and Cohen, G.N. Ann.Inst.Pasteur (1958) 94, 73.

52. Grenson, M. and Hennaut, C. J.Bacteriol. (1971) 105, 477.
53. Grenson, M., Hou, C. and Crabeel, M. J.Bacteriol. (1970) 103, 770.
54. Larimore, F.S. and Roon, R.J. Biochemistry (1978) 17, 431.
55. Larimore, F.S., Kuisk, I., Korkowski, P.M. and Roon, R.J. Arch.Biochem.Biophys. (1980) 204, 234.
56. Rytko, J. J.Bacteriol. (1975) 121, 562.
57. Brandriss, M.C. and Magasanik, B. J.Bacteriol. (1979) 140, 498.
58. Lasko, P.F. and Brandriss, M.C. J.Bacteriol. (1981) 148. 241.
59. Horák, J. and Říhová, L. Biochim.Biophys.Acta (1982) 691, 144.
60. Shukla, H., Viswanathan, L. and Singh, M. Biochem.Int. (1982) 5, 253.
61. Verma, R.S., Rao, T.V.G. and Prasad, R. Biochim.Biophys. Acta (1984) 778, 289.
62. Grenson, M., Mousset, M., Wiame, J.M. and Bechet, J. Biochim.Biophys.Acta (1966) 127, 325.
63. Grenson, M. Biochim.Biophys.Acta (1966) 127, 339.
64. Crabeel, M. and Grenson, M. Eur.J.Biochem. (1970) 14, 197.
65. Gits, J.J. and Grenson, M. Biochim.Biophys.Acta (1967) 135, 507.
66. Stoppani, A.O.M. and Ramos, E.H. en Biochemistry and Genetics of Yeast (1978) (Bacila, M., Horecker, B. and Stoppani, A.O.M. editores) Academic Press, New York. pág. 171.

67. Ramos, E.H., Bongioanni, L.C. de, Cuesta Casado, M.C. and Stoppani, A.O.M. *Biochim.Biophys.Acta* (1977) 467, 220.
68. Gregory, M.E., Keenan, M.H.J. and Rose, A.H. *J.Gen. Microbiol.* (1982) 128, 2557.
69. Grenson, M. and Dubois, E. *Eur.J.Biochem.* (1982) 121, 643.
70. Darte, C. and Grenson, M. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* (1975) 67, 1028.
71. Broach, J.M., Strathern, J.N. and Hicks, J.B. *Gene* (1979) 8, 121.
72. Mortimer, R.K. and Hawthorne, D.C. *Genetics* (1973) 74, 33.
73. Whelan, W.L., Goeke, E. and Manney, T.S. *Genetics* (1979) 91, 35.
74. Ono, B.I., Ishino, Y. and Shinoda, S. *J.Bacteriol.* (1983) 154, 1476.
75. Hoffman, W. *J.Biol.Chem.* (1985) 260, 11831.
76. Kotliar, N. and Ramos, E.H. *Biochim.Biophys.Acta* (1983) 734, 378.
77. Ephrussi, B., Hottinger, J. and Chimenes, A.M. *Ann.Inst. Pasteur* (1949) 76, 351.
78. Tzagolott, A., Foury, F. and Macino, G. en *Biochemistry and Genetics of Yeasts* (1978) (Bacila, M., Horecker, B. and Stoppani, A.O.M. editores) Academic Press, New York. pág. 477.
79. Grenson, M., Dubois, E., Piotrowska, M., Drillien, R., and Aigle, M. *Mol.Gen.Genet.* (1974) 128, 73.
80. Grenson, M. and Hou, C. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* (1972) 48, 749.
81. Dubois, E., Grenson, M. and Wiame, J.M. *Eur.J.Biochem.*

- (1974) 48, 603.
82. Grenson, M. Eur.J.Biochem. (1983) 133, 135.
83. Legrain, C., Vissers, S., Dubois, E., Legrain, M. and Wiame, J.M. Eur.J.Biochem. (1982) 123, 611.
84. Grenson, M. and Acheroy, B. Mol.Gen.Genet. (1982) 188, 261.
85. Grenson, M. Eur.J.Biochem. (1983) 133, 141.
86. Brandriss, M.C. and Magasanick, B. J.Bacteriol. (1980) 143, 1403.
87. Tomenchok, D.M. and Brandriss, M.C. J.Bacteriol. (1987) 169, 5364.
- 88 Courchesne, W.E. and Magasanick, B. Mol.Cell.Biol. (1983) 3, 672.
89. Kotyk, A. and Říhová, L. Biochim.Biophys.Acta (1972) 288, 380.
90. Ramos, E.H., Bongioanni, L.C. de, Wainer, S.R. and Stoppani, A.O.M. Biochim.Biophys.Acta (1983) 731, 361.
91. Wiemken, A. Meth.Cell.Biol. (1975) 12, 99.
92. Durr, M., Urech, K., Boller, T., Wiemken, A. Schwencke, J. and Nagy, M. Arch.Microbiol. (1979) 121, 169.
93. Ohsumi, Y. and Anraku, Y. J.Biol.Chem. (1981) 256, 2079.
94. Kakinuma, Y., Ohsumi, Y. and Anraku, Y. J.Biol.Chem. (1981) 256, 10859.
95. Kaback, H.R. Ann.Rev.Biophys.Biophys.Chem. (1986) 15, 279.
96. Mitchell, P. Eur.J.Biochem. (1979) 95, 1.
97. Mitchell, P. Science (1979) 206, 1148.
98. Ramos, S., Schuldiner, S. and Kaback, H.R. Proc.Natl. Acad.Sci. USA (1976) 73, 1892.

99. Seaston, A., Inkson, C. and Eddy, A.A. *Biochem.J.* (1973) 134, 1031.
100. Cockburn, M., Earnshaw, R. and Eddy, A.A. *Biochem.J.* (1975) 146, 705.
101. Sanders, D., Slayman, C.L. and Pall, M.L. *Biochim. Biophys.Acta* (1983) 735, 67.
102. Christensen, H.N. *J.Membr.Biol.* (1985) 84, 97.
103. Goffeau, A. and Slayman, C.W. *Biochim.Biophys.Acta* (1981) 639, 197.
104. Serrano, R. *Curr.Top.Cell.Reg.* (1984) 23, 87.
105. Malpartida, F. and Serrano, R. *FEBS Lett.* (1980) 111, 69.
106. Malpartida, F. and Serrano, R. *Eur.J.Biochem.* (1981) 116, 413.
107. Serrano, R., Kielland-Brandt, M.C. and Kink, G.R. *Nature* (1986) 319, 689.
108. Portillo, F. and Serrano, R. *Eur.J.Biochem.* (1989) 186, 501.
109. Portillo, F., Larrinoa, I.F. and Serrano, R. *FEBS Lett.* (1989) 247, 381.
110. Ballarin-Denti, A., Den Hollander, J.A., Sanders, D., Slayman, C.W. and Slayman, C.L. *Biochim.Biophys.Acta* (1984) 778, 1.
111. Barts, P.W.J.A., Hoerberichts, J.A., Klaassen, A. and Borst-Pauwels, G.W.F.H. *Biochim.Biophys.Acta* (1980) 597, 125.
112. Eraso, P., Mazón, M.J. and Gancedo, J.M. *Biochim. Biophys.Acta* (1984) 778, 516.
113. Slavík, J. *FEBS Lett.* (1982) 140, 22.
114. Slavík, J. and Kotyk, A. *Biochim.Biophys.Acta* (1984) 766, 679.

115. De la Peña, P., Barros, F., Gascón, S., Ramos, S. and Lazo, P.S. *Eur.J.Biochem.* (1982) 123, 447.
116. Eddy, A.A. and Nowacki, J.A. *Biochem.J.* (1971) 122, 701.
117. Kotyk, A., Horák, J. and Knotková, A. *Biochim.Biophys. Acta* (1982) 698, 243.
118. Kováč, L., Bednářová, H. and Greksák, M. *Biochim. Biophys.Acta* (1968) 153, 32.
119. Wickerham, L.J. *Taxonomy of yeasts. I Techniques classification.* United States Department of Agriculture (1951) *Tech.Bull.* N°129.
120. Vavra, J.J. and Johnson, M.J. *J.Biol.Chem.* (1956) 220, 33.
121. Lowry, O.H., Rosenbrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J. *J.Biol.Chem.* (1951) 193, 265.
122. Rottenberg, H. *Meth.Enzymol.* (1979) 55, 547.
123. Krebs, H.A., Wiggins, D., Stubbs, M., Sols, A. and Bedoya, F. *Biochem.J.* (1983) 214, 657.
124. Bongioanni, L.C. de and Ramos, E.H. *Rev.Arg.Microbiol.* (1988) 20, 1.
125. Bray, G.A. *Anal.Biochem.* (1960) I, 279.
126. Pascual, C., Romay, C. and Sigler, K. *Folia Microbiol.* (1983) 28, 353.
127. Sigler, K., Pascual, C., Romay, C. *Folia Microbiol.* (1983) 28, 363.
128. Serrano, R. *Eur.J.Biochem.* (1980) 105, 419.
129. Goffeau, A. and Slayman, C.W. *Biochim.Biophys.Acta* (1981) 639, 197.
130. Ramos, E.H., Bongioanni, L.C. de and Stoppani, A.O.M. *Biochim.Biophys.Acta* (1980) 599, 214.
131. Meyer, H.P., Käpeli, O. and Fiechter, A. *Ann.Rev. Microbiol.*(1985) 39, 299.

132. Borst, P. and Grivell, L.A. *Cell* (1978) 15, 705.
133. Šubík, J., Takácsová, G. and Kováč, L. *Mol.Gen.Genet.* (1978) 166, 103.
134. Gbelska, Y., Šubík, J. Svoboda, A., Goffeau, A. and Kováč, L. *Eur.J.Biochem.* (1983) 130, 281.
135. Khan, N.A., Zimmermann, F.K. and Eaton, N.R. *Mol.Gen. Genet.* (1973) 123, 43.
136. Evans, I.H., Diala, E.S., Earl, A. and Wilkie, D. *Biochim.Biophys.Acta* (1980) 602, 201.
137. Wilkie, D. and Evans, I.H. *Trend.Biochem.Sci.* (1982) 7, 147.
138. Finzi, E., Clejan, L. and Beattie, D.S. *Membr.Biochem.* (1985) 5, 291.
139. Cid, A. and Serrano, R. *J.Biol.Chem.* (1988) 263, 14134.
140. Hoeberichts, J.A., Hulsebos, T.H.J.M., Van Wezenbeek, P.M.G.F., Borst-Pauwels, G.W.F.H. *Biochim.Biophys.Acta* (1980) 595, 126.
141. Salhany, J.M., Yamane, T., Shulman, R.G. and Ogawa, S. *Proc.Natl.Acad.Sci. USA* (1975) 72, 4966.
142. Kováč, L. and Varečka, Ľ. *Biochim.Biophys.Acta* (1981) 637, 209.
143. Kováč, L. and Poliachová, V. *Biochem.Int.* (1981) 2, 503.
144. Bakker, R., Dobbelmann, J. and Borst-Pauwels, G.W.F.H. *Biochim.Biophys.Acta* (1986) 861, 205.
145. Horák, J. and Kotyk, .A. *Biochim.Biophys.Acta* (1986) 857, 173.
146. Ferro-Luzzi Ames, G. *Ann.Rev.Biochem.* (1986) 55, 397.