

Tesis de Posgrado

Transporte de ácido delta-aminolevulínico en *Saccharomyces cerevisiae*

Bermudez Moretti, Mariana

1994

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:

Bermudez Moretti, Mariana. (1994). Transporte de ácido delta-aminolevulínico en *Saccharomyces cerevisiae*. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2693_BermudezMoretti.pdf

Cita tipo Chicago:

Bermudez Moretti, Mariana. "Transporte de ácido delta-aminolevulínico en *Saccharomyces cerevisiae*". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1994. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2693_BermudezMoretti.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 Acido δ -aminolevulínico en
Saccharomyces cerevisiae

MARIANA BERMUDEZ MORETTI



TESIS 1994

2693
Ej. 2

FCE y N BIBLIOTECA

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

TRANSPORTE DE ACIDO δ -AMINOLEVULINICO
EN *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

por MARIANA BERMUDEZ MORETTI

Director: Dra. Alcira María del Carmen Batlle

Centro de Investigaciones sobre Porfirinas y Porfirias
(CIPYP). Departamento de Química Biológica. Facultad de
Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.
Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas
(CONICET)

Tesis presentada para optar al título de:

DOCTOR DE LA UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

1994

A mi familia

INDICE GENERAL

	Página
AGRADECIMIENTOS	i
ABREVIATURAS	iii
OBJETIVOS	v
INTRODUCCION	1
- CAPITULO I: LEVADURAS	1
I.1. Generalidades	1
I.2. Características de las levaduras	2
- CAPITULO II: CAMINO BIOSINTETICO DE LAS PORFIRINAS	8
II.1. Biosíntesis del hemo	8
II.2. Regulación de la biosíntesis del hemo	11
- CAPITULO III: TRANSPORTE A TRAVES DE MEMBRANA	15
III.1. Procesos de transporte	15
III.2. Transporte de aminoácidos	16
MATERIALES Y METODOS	33
- CAPITULO I: MATERIALES	33
I.1. Cepas	33
I.2. Reactivos	35

	Página
- CAPITULO II: METODOS	36
II.1. Cultivo y crecimiento de las células	36
II.2. Ensayo de incorporación de ^{14}C -ALA	38
II.3. Ensayo de incorporación de ^3H -GABA	39
II.4. Determinación de parámetros cinéticos	39
II.5. Recuperación y análisis del ^{14}C acumulado en las células	40
II.6. Recuperación y análisis del ^3H acumulado en las células	41
II.7. Salida y desplazamiento de ALA intracelular	41
II.8. Determinación del pH óptimo	42
II.9. Ensayos de inhibición de la incorporación	42
II.10. Obtención de la proteína enzimática	42
II.11. Sistemas standard de incubación	43
II.12. Determinación de ALA	44
II.13. Determinación de PBG	45
II.14. Determinación del contenido proteico	46
II.15. Determinación de ALA intracelular	47
II.16. Obtención de protoplastos	47
II.17. Shock osmótico	48

	Página
RESULTADOS	49
- CAPITULO I: TRANSPORTE DE ALA	49
I.1. Curvas de crecimiento	49
I.2. Entrada e incorporación de ALA	50
I.3. Recuperación y análisis del ^{14}C acumulado	58
I.4. Salida y desplazamiento de ALA acumulado	60
I.5. Lavado de las muestras	61
I.6. Determinación del pH óptimo	63
I.7. Inhibidores del metabolismo energético	64
I.8. Especificidad del sistema transportador de ALA	66
I.9. Parámetros cinéticos	70
I.10. Caracterización y función de grupos sulfhidrilos en la proteína translocadora	76
I.11. Determinación de la actividad de las enzimas que sintetizan y consumen ALA	77
I.12. Incorporación de ALA en células crecidas en presencia de ALA	82
I.13. Transporte de PBG	84
I.14. Conclusiones	86

	Página
- CAPITULO II: TRANSPORTE DE GABA	88
II.1. Identificación de los sistemas transportadores	88
II.2. Recuperación y análisis del ^3H acumulado intracelularmente	92
II.3. Efecto de las fuentes de carbono y de nitrógeno	92
II.4. Regulación de la incorporación de GABA por GABA	93
II.5. Especificidad del sistema de transporte de GABA	96
II.6. Estudios cinéticos	99
II.7. Conclusiones	100
- CAPITULO III: RELACION ENTRE LOS SISTEMAS DE TRANSPORTE DE ALA Y GABA	102
III.1. Transporte de ALA	102
III.2. Transporte de GABA	108
III.3. Conclusiones	111
- CAPITULO IV: TRANSPORTE DE ALA EN CEPAS <i>hem1</i>	114
IV.1. Curvas de crecimiento	114
IV.2. Incorporación de ALA	115
IV.3. Diferentes condiciones de crecimiento	116
IV.4. Actividades enzimáticas	117
IV.5. Sistemas de transporte	119

IV.6. Efecto de compuestos que inhben el transporte de ALA sobre el crecimiento celular	123
IV.7. Conclusiones	125
DISCUSION	126
REFERENCIAS	133

AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar mi reconocimiento a todos aquellos cuya colaboración posibilitó la realización de este trabajo de tesis.

A Alcira, mi directora, por haberme iniciado en la investigación científica, por su apoyo, invaluable experiencia y la amplia libertad que me dió para llevar a cabo este trabajo.

A la Dra. Eugenia H. Ramos, por haberme brindado la posibilidad de desarrollar gran parte de este trabajo en su laboratorio, facilitando generosamente toda la infraestructura necesaria, pero fundamentalmente por su guía y contribución personal.

Al Dr. James R. Mattoon, por haberme cedido las cepas de *Saccharomyces cerevisiae*, por sus comentarios y valiosas sugerencias.

A Susana, por su incondicional amistad, sus siempre criteriosos consejos, su compañía y ayuda.

A Mónica, Daniel y Adrián, quienes no sólo hicieron grato mi trabajo en el laboratorio sino que desinteresadamente aportaron ideas y colaboración personal.

A mis compañeros del CIPYP, por los agradables momentos que pasamos juntos.

Al Dr. Carlos Stella, por la enseñanza de algunas de las técnicas empleadas en este trabajo.

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), por las becas y subsidios otorgados que hicieron posible este trabajo y mi dedicación a la investigación científica.

ABREVIATURAS

ALA	Acido δ -aminolevúlico
ALA-D	Acido δ -aminolevúlico Dehidrasa
ALA-I	Acido δ -aminolevúlico Intracelular
ALA-S	Acido δ -aminolevúlico Sintetasa
CCCP	Carbamilcianuro-3-clorofenilhidrazona
COPROGEN	Coproporfirinógeno
CPG-asa	Coproporfirinógeno Oxidasa
DCCD	NN'-diciclohexilcarbodiimida
DES	Dietilstilbestrol
DNP	Dinitrofenol
DTNB	5,5'-ditiobis(2-nitrobenzoato)
EDTA	Acido etilindiaminotetraacético
Fe-quel	Ferroquelatasa
GABA	Acido γ -aminobutírico
GAP	Permeasa General de Aminoácidos
HEMO-S	Hemo Sintetasa
HMB	Hidroximetilbilano
NADP	Nicotinamido adenin dinucleótido fosfato
NEMI	N-etilmaleimida
PBG	Porfobilinógeno
PCMB	p-Cloromercuribenzoato
PROTO	Protoporfirina

PROTOGEN	Protoporfirinógeno
PTG-asa	Protoporfirinógeno Oxidasa
SSA	Succinato semialdehído
TCA	Acido tricloroacético
URO-D	Uroporfirinógeno Decarboxilasa
UROGEN	Uroporfirinógeno
UROGEN III-S	Uroporfirinógeno III Sintetasa

OBJETIVOS

La estructura tetrapirrónica de las porfirinas es la base química de una serie de compuestos imprescindibles para la vida, involucrados en los procesos fundamentales de respiración y fotosíntesis, a través del hemo y la clorofila, respectivamente. Los tetrapirroles también participan en otras reacciones metabólicas importantes como transportadores de electrones, energía y gases, oxidaciones biológicas, fijación de nitrógeno, etc.

La secuencia de eventos enzimáticos que conducen a la biosíntesis de estos compuestos está hoy día, muy bien documentada y se ha comprobado que es prácticamente idéntica en todas las células vivientes.

Sin embargo, aún queda bastante por esclarecer acerca del mecanismo de acción de las enzimas involucradas, y es aún poco lo que se sabe en cuanto a los procesos de entrada de los precursores de esta vía, ácido δ -aminolevulínico (ALA) y porfobilinógeno (PBG), a la célula.

El transporte de un metabolito a través de la membrana plasmática puede ser un paso limitante en su metabolización intracelular.

El ALA, primer compuesto específico de la vía del hemo, se forma en la mitocondria y para su posterior

metabolización a PBG en el citosol debe atravesar la membrana de esta organela. Durante muchos años se ha hablado de la existencia de una permeasa de ALA, sin embargo, como se ha señalado es muy limitada la información sobre este aspecto tan importante en la síntesis de porfirinas.

Existen cepas de *Saccharomyces cerevisiae* deficientes en la actividad de ALA-Sintetasa que son capaces de crecer utilizando el ALA provisto por el medio de cultivo. Teniendo en cuenta esta capacidad, además del hecho de que la levadura es un importante modelo experimental de organismo eucariótico, se decidió estudiar el transporte de ALA en *S. cerevisiae*.

Los resultados de esta investigación contribuirán sin lugar a dudas a un mejor y más profundo conocimiento de la vía metabólica de las porfirinas y de su regulación.

El objetivo fundamental de este trabajo fue caracterizar exhaustivamente el sistema de transporte de ALA en *S. cerevisiae*, así como identificarlo, determinar su especificidad y sus mecanismos de regulación.

Debemos tener presente que en las porfirias agudas, por fallas en la regulación del camino de las porfirinas, se acumula ALA en las células, incluyendo las del sistema nervioso, al cual se le atribuye el conocido síndrome neurológico que caracteriza a estas enfermedades. La

caracterización y conocimiento del sistema de transporte de ALA a través de membrana no sólo es de gran interés por estas causas sino que podrá contribuir al control y posiblemente al desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas.

Sobre estas bases, para lograr los propósitos de este trabajo, empleando cepas silvestres y mutantes de *S. cerevisiae* se han de determinar en primer lugar las condiciones de crecimiento que permitan el óptimo estudio del sistema de transporte de ALA. Para su caracterización, se han de establecer sus requerimientos en cuanto a las fuentes de carbono y de nitrógeno, las condiciones para que una vez transportado ocurra un mínimo de metabolización, así como eflujo e intercambio con ALA extracelular. Es importante establecer la dependencia energética del proceso y su especificidad, además de la influencia de la concentración de protones sobre este sistema. La cinética del proceso ha de indicar tanto la afinidad como el número de sistemas de transporte posibles. Es asimismo fundamental, tratándose como probablemente sea, de un transportador activo, definir su control por el mismo ALA.

Por otra parte, como se conoce y se ha indicado que el ALA puede interferir con la acción del GABA, dada su

similitud estructural, se ha de estudiar en particular la acción del GABA sobre el sistema de transporte de ALA.

Se ha de caracterizar además el sistema de transporte de GABA en *S. cerevisiae*, en forma similar al del ALA en cuanto a requerimientos, especificidad, regulación por GABA y ALA y cinética.

Finalmente se han de relacionar los sistemas de transporte de ALA y GABA y se intentará hallar evidencias de que podría existir una permeasa común.

INTRODUCCION

LEVADURAS

	Página
I.1. Generalidades	1
I.2. Características de las levaduras	2

I. LEVADURAS

I.1. Generalidades

Durante muchos años las levaduras han sido consideradas como uno de los sistemas biológicos de elección a la hora de estudiar innumerables cuestiones de tipo bioquímico y genético. Ello se debe a que estos organismos ofrecen, además de las ventajas propias de un microorganismo, otras interesantes posibilidades como es, la gran capacidad de crecimiento en periodos cortos de tiempo y con una gran economía de medio, y todas las características propias de las células eucarióticas. Las levaduras comparten con el resto de los organismos eucariotas, tanto proteínas específicas (ARN polimerasas, histonas, actina, tubulina, hormonas peptídicas...) como orgánulos y estructuras macromoleculares (cromosomas, membrana nuclear, mitocondrias, ribosomas 80S, retículo endoplásmico rugoso, Golgi...). La aplicación de las técnicas de clonación, que permiten su manipulación genética, ha convertido a este organismo en el sistema experimental más versátil disponible hasta el momento, para el estudio de la organización molecular de las células eucarióticas.

De las diferentes especies de levaduras la más estudiada y conocida es *Saccharomyces cerevisiae*.

I.2. Características de las levaduras

Las levaduras son organismos heterotróficos capaces de utilizar carbohidratos y una amplia variedad de otros compuestos orgánicos como nutrientes. De todos estos compuestos derivan los esqueletos carbonados, necesarios para sintetizar los constituyentes celulares y para proveer la energía requerida por las reacciones bioquímicas.

En la Figura I.1 se presenta un esquema general del metabolismo de carbono y energético. Glucosa, fructosa y manosa son utilizados por más de 400 especies de levaduras (Barnett, 1976). Por el contrario, la utilización de otros compuestos carbonados como ciertos azúcares (Barnett, 1976) o aminoácidos (Santa María y Sánchez, 1977) varía entre especies.

El nitrógeno también es un elemento esencial para el metabolismo celular y las levaduras son capaces de utilizar gran diversidad de compuestos nitrogenados presentes en su entorno. Estos compuestos pueden ser empleados como fuente de nitrógeno o como precursores biosintéticos que se incorporan en macromoléculas sin ser catabolizados previamente. En la Figura I.2 se muestran las principales reacciones involucradas en la utilización de nitrógeno en *Saccharomyces cerevisiae*.

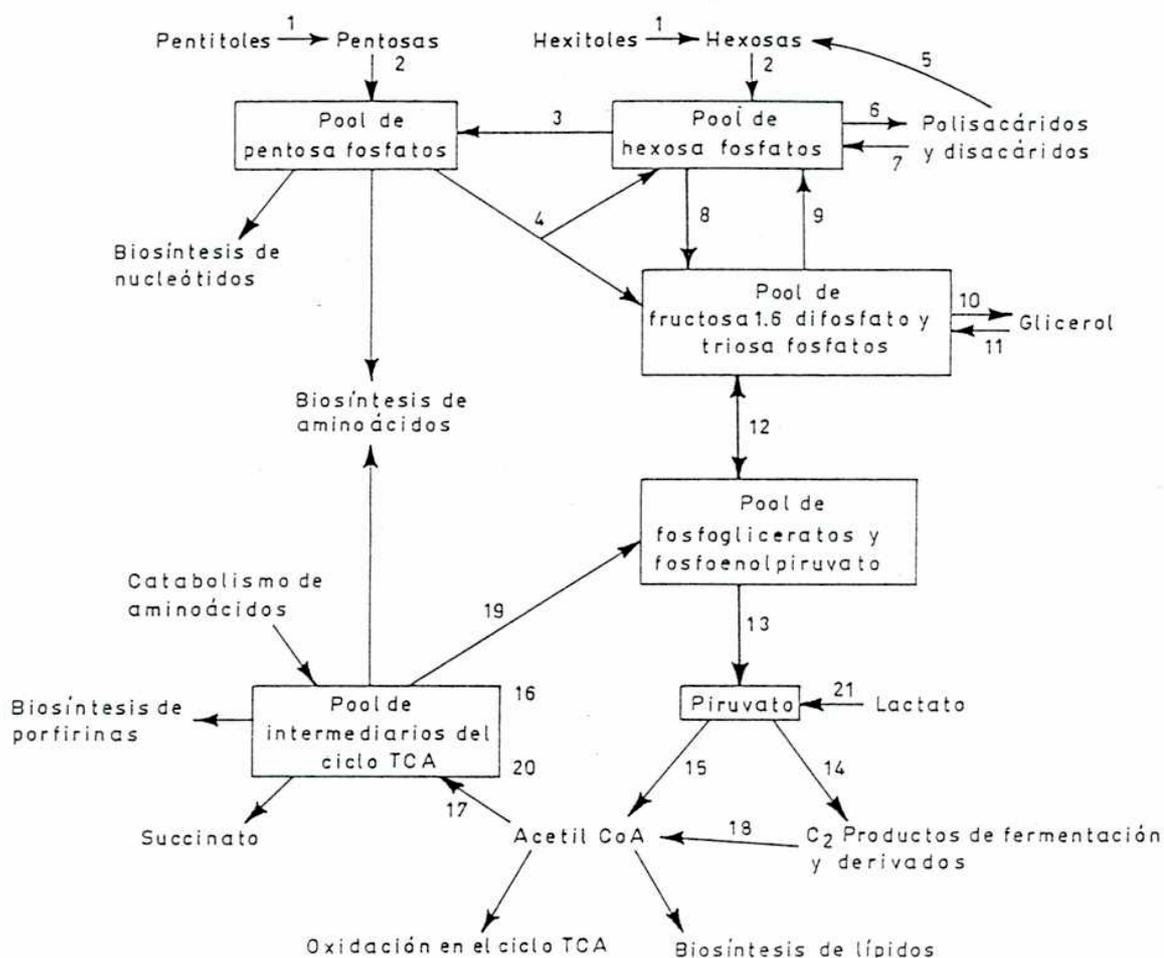


Figura I.1: Esquema general del metabolismo de carbono y energético en levaduras. : camino glicolítico. 1, alditol deshidrogenasa; 2, azúcar quinasa; 3, rama oxidativa (irreversible) de la vía de las pentosas; 4, rama no oxidativa (reversible) de la vía de las pentosas; 5, glicosidasas; 6, biosíntesis de polisacáridos; 7, glucógeno fosforilasa; 8, fosfofructoquinasa; 9, fructosa-1,6-difosfataza; 10, glicerol P deshidrogenasa y glicerol P fosfataza; 11, glicerol quinasa y glicerol P ubiquinona óxidoreductasa; 12, gliceraldehído 3P deshidrogenasa y fosfoglicerato quinasa; 13, piruvato quinasa; 14, piruvato decarboxilasa y óxidoreducciones y condensaciones; 15, piruvato deshidrogenasa; 16, piruvato carboxilasa; 17, ciclo del glioxalato; 18, acetato tioquinasa; 19, fosfoenolpiruvato carboxiquinasa; 20, enzima málica; 21, lactato deshidrogenasa.

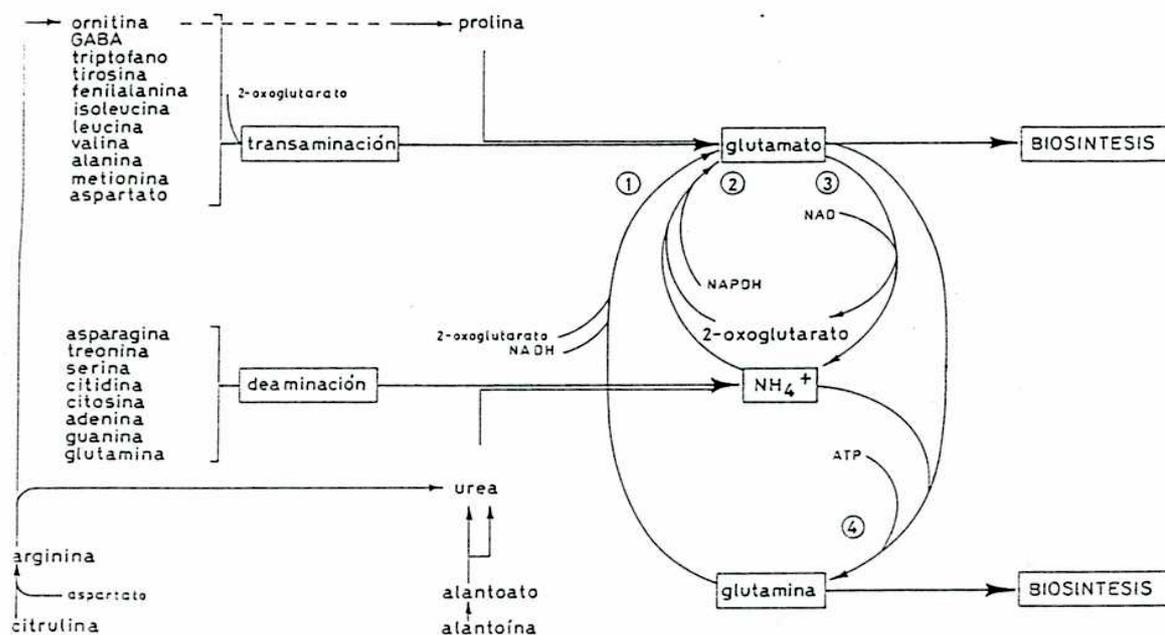


Figura I.2: Esquema general de las principales reacciones involucradas en la utilización de nitrógeno en *S. cerevisiae* crecida sobre diferentes compuestos nitrogenados.

1, glutamato sintetasa; 2, glutamato deshidrogenasa (anabólica); 3, glutamato deshidrogenasa (catabólica); 4, glutamina sintetasa.

Las células de levadura son aeróbicas facultativas; el crecimiento celular en condiciones aeróbicas es 10 veces mayor que en condiciones anaeróbicas.

El tamaño de las células varía con la ploidía, la fase de crecimiento y la cepa. Generalmente, las células haploides son esféricas con un diámetro de 4 μm y las diploides ovales de 5 x 6 μm .

El genoma de *S. cerevisiae* está constituido por 16-17 cromosomas que se están caracterizando tanto física como genéticamente.

Las levaduras presentan un ciclo de vida haplo-diploide (Figura I.3).

Así, las células haploides, denominadas α y a , se reproducen vegetativamente a lo largo de un ciclo mitótico típico por un proceso de gemación. Este ciclo de proliferación sólo se interrumpe en respuesta a dos tipos de estímulos ambientales. El primero de ellos es la ausencia de nutrientes en el entorno; en estas circunstancias las células se detienen en la fase G1 del ciclo celular hasta que un aporte de nutrientes les permita reanudar las divisiones mitóticas. El segundo estímulo ambiental que interrumpe el ciclo es la presencia de células del tipo sexual opuesto; en este caso las células en fase G1 inician un proceso de conjugación que resulta en una fusión celular

y nuclear para dar lugar a un individuo diploide a/α . Al igual que las formas haploides, estas células diploides en presencia de suficientes nutrientes pueden proliferar asexualmente por gemación hasta que en determinadas circunstancias, fundamentalmente cuando se enfrentan a una privación de fuente de nitrógeno, sufren una división reduccional (meiosis) originando cuatro ascosporas haploides incluidas en un asca, dos de cada tipo sexual, que en condiciones adecuadas germinan, completando el ciclo biológico.

La determinación del tipo reproductor está dominado por un locus regulatorio denominado MAT. Muchas cepas de *S. cerevisiae* se pueden mantener a lo largo de múltiples generaciones en estado haploide a o α y la formación de individuos diploides sólo ocurre cuando se ponen en contacto los dos tipos sexuales. Estas cepas se conocen como heterotálicas y entre ellas se encuentran una gran parte de las utilizadas en el laboratorio. Sin embargo, la mayoría de las cepas aisladas de la naturaleza presentan un comportamiento distinto, ya que en las sucesivas divisiones mitóticas, una célula de un tipo sexual determinado puede cambiar al tipo sexual opuesto, lo que conduce a la existencia de ambas formas sexuales en la población, que

inmediatamente conjugan para dar lugar a individuos diploides. Este estado se denomina homotalismo.

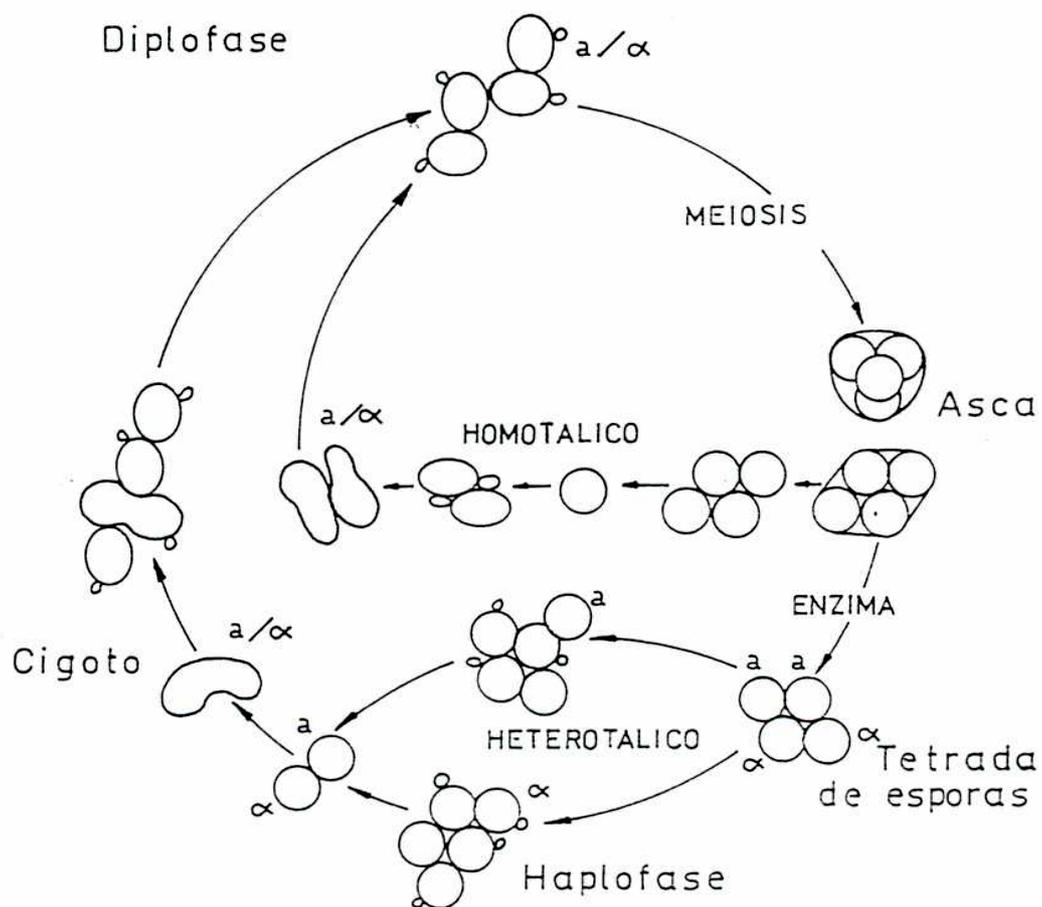


Figura I.3: Ciclo de vida sexual de la levadura.

CAMINO BIOSINTETICO DE LAS PORFIRINAS

	Página
II.1. Biosíntesis del hemo	8
II.2. Regulación de la biosíntesis del hemo	11

II. CAMINO METABOLICO DE LAS PORFIRINAS

II.1. Biosíntesis del hemo

El rol vital y ubicuo de las porfirinas está demostrado, por ejemplo, por su función como grupo prostético de una gran variedad de hemoproteínas, incluyendo hemoglobina, mioglobina, citocromos, peroxidasas, catalasas, etc. Además, en algunas bacterias, el camino de las porfirinas se deriva hacia la síntesis de corrinas, vitamina B12, y en los organismos fotosintéticos, hacia la rama de las clorofilas y bacterioclorofilas.

La mayoría de las células vivas son capaces de sintetizar sus tetrapirroles, a partir de precursores muy simples tales como succinato y glicina.

El camino biosintético del hemo se ilustra en la Figura II.1.

La δ -aminolevúlico Sintetasa (ALA-S) es la primera enzima específica del camino, y sintetiza ácido δ -aminolevúlico (ALA) a partir de glicina y succinil CoA.

La biosíntesis continúa con la formación del monopirrol porfobilinógeno (PBG) originado por acción de la enzima δ -aminolevúlico Dehidrasa (ALA-D) sobre dos moléculas de ALA. Luego se forma uroporfirinógeno III (UROGEN) por la acción combinada de dos enzimas. La PBG-Deaminasa (también

conocida como Uroporfirinógeno I Sintetasa o Hidroximetilbilano Sintetasa) une cuatro moléculas de PBG por condensación secuencial "cabeza-cola" para dar lugar a la formación del tetrapirrol de cadena abierta hidroximetilbilano (HMB), el cual en ausencia de la segunda enzima, la Uroporfirinógeno Sintetasa (UROGEN III-S) (también llamada Isomerasa o Cosintetasa) se cicla químicamente para dar UROGEN I. En presencia de Urogen III-S, los sustituyentes en los carbonos β del anillo D se invierten antes de la ciclación, formándose así la estructura asimétrica UROGEN III. De allí en adelante, la Uroporfirinógeno Decarboxilasa (URO-D) decarboxila secuencialmente cuatro grupos acetilo del UROGEN III dando lugar finalmente al coproporfirinógeno III (COPROGEN III) con cuatro carboxilos. La URO-D también puede actuar sobre el UROGEN I para formar COPROGEN I, pero sólo el COPROGEN III es decarboxilado oxidativamente a protoporfirinógeno IX (PROTOGEN IX) por la Coproporfirinógeno Oxidasa (CPG-asa). En el siguiente paso, seis átomos de hidrógeno son eliminados del PROTOGEN IX por la Protoporfirinógeno Oxidasa (PTG-asa) formando protoporfirina IX (PROTO IX). Por último, la enzima Ferroquelatasa (Fe-quel) o Hemosintetasa (Hemo-S) inserta un ión ferroso en el anillo porfirina para dar hemo.

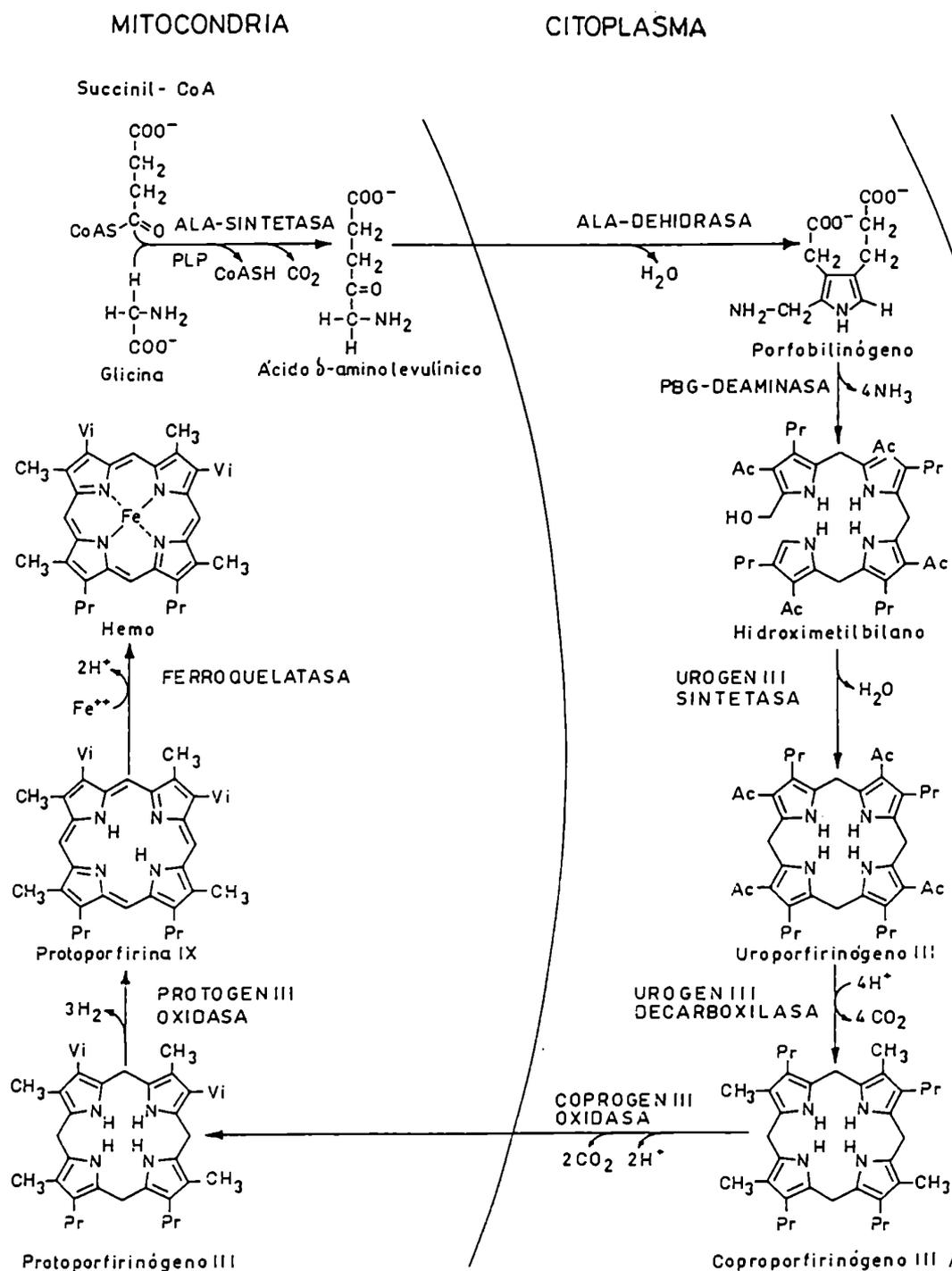


Figura II.1: Camino biosintético del hemo en levaduras.

En la mayor parte de los organismos estudiados la primera y las tres últimas enzimas de esta vía biosintética son mitocondriales mientras que las cuatro restantes son citosólicas. En levaduras, sin embargo, la CPG-asa se encuentra en citosol (Camadro y col., 1986).

II.2. Regulación de la biosíntesis del hemo

En la mayoría de los organismos (Burnham y Lascelles, 1963; Clark-Walker y col., 1967; Granick y Sassa, 1971; Sinclair y Granick, 1975) la regulación de la biosíntesis de porfirinas es fundamentalmente a nivel de la primera enzima, el ALA-S, descartándose un rol regulatorio para el ALA-D ya que esta enzima está presente en cantidades no limitantes.

Por el contrario, en levaduras existen numerosas evidencias que avalan la hipótesis de que el ALA-D modula este camino biosintético. Se ha demostrado que esta enzima está fuertemente reprimida por glucosa (Jayaraman y col., 1971; Labbe-Vois y Volland, 1977; Labbe-Bois y Labbe, 1978; Mahler y Lin, 1978; Mattoon y col., 1978; Correa García y col., 1993). Así, el control por catabolito de la síntesis de citocromos estaría ejercido principalmente a través del ALA-D (Mahler y Lin, 1978). En ciertas mutantes regulatorias, también se observó que el ALA-D y los

citocromos exhiben una resistencia coordinada a la represión por catabolito (Borrvalho y col., 1983, 1989).

Asimismo, Arrese y col. (1983) clonaron el gen *HEM1*, que codifica para el ALA-S, en un plásmido multicopia y con él transformaron una mutante *hem1*. Las células transformadas mostraron una actividad de ALA-S 20 veces mayor que la enzima de la cepa normal, mientras que el nivel de citocromos se restauró sólo hasta valores normales, tanto en un medio con glucosa como con etanol. Este resultado indicó que la producción de ALA no sería limitante en la síntesis de citocromos. En cambio, la función regulatoria fue atribuida al ALA-D ya que las células transformadas acumularon entre 5 y 8 veces más ALA que las células normales.

Por otra parte, si bien el ALA-S no sería la enzima regulatoria por excelencia en la biosíntesis de citocromos en levadura, varios trabajos realizados con distintas mutantes han indicado que es una enzima altamente regulada y que su rol es aparentemente muy complejo.

Así, se observó que cepas bloqueadas en la conversión de UROGEN a COPROGEN (Gollub y col., 1977; Malamud y col., 1983) o de COPROGEN a PROTOGEN (Gunge y col., 1967; Miyake y col., 1972) acumulan ALA en grandes cantidades. Rytka y colaboradores (1984) demostraron por

primera vez, que mutantes parcialmente deficientes en URO-D poseen una actividad de ALA-S aumentada significativamente. Estos resultados sugieren que la actividad y/o síntesis de ALA-S también estarían sujetas a un control negativo por hemo. Por su parte, Borralho y colaboradores (1989) encontraron que la glucosa ejerce una acción regulatoria sobre la actividad del ALA-S pero ésta no implica necesariamente represión de los citocromos mitocondriales.

En 1987, Keng y Guarente demostraron que la expresión del gen que codifica para el ALA-S (HEM1) está controlada por dos sitios regulatorios opuestos: uno positivo y otro negativo. El sitio positivo UAS ("upstream activator site") es activado por el sistema HAP2-HAP3 que controla globalmente la expresión de varios genes involucrados en el metabolismo regulatorio. Este sistema mantendría la expresión de HEM1 en ausencia de hemo. Sin embargo, la expresión de este gen no se desreprime por una fuente de carbono no fermentable (Mahler y Lin, 1974) como sucede con otros genes regulados por HAP2-HAP3 (Guarente y col., 1984). Aparentemente, la desrepresión está impedida por la presencia de un segundo sitio negativo que está localizado ligeramente "downstream" de la secuencia UAS y que está controlado por hemo.

Por otra parte, también se ha propuesto que la CPGasa tendría un importante rol regulatorio ya que se ha demostrado claramente que la síntesis de esta enzima está sujeta a un control negativo por oxígeno y hemo. Esta regulación opera a nivel transcripcional (Zagorec y Labbe-Bois, 1986; Zagorec y col., 1988).

Asimismo, existen evidencias de una débil represión por glucosa en la expresión del gen de la Fe-quel (Labbe-Bois, 1990). Se ha propuesto también que el funcionamiento de esta enzima está regulado por el aporte de sustratos (hierro y PROTO) y, quizás de manera más importante, por la demanda de hierro por parte de las distintas apoproteínas sintetizadas a diferentes velocidades, dependiendo de las condiciones fisiológicas de las células.

Por último, cabe destacar que el hemo participa en la regulación de la biosíntesis de muchas hemoproteínas de levadura, que están involucradas en procesos conectados con la presencia y utilización del oxígeno molecular en las células vivas. El grupo prostético hemo ejerce su efecto en diferentes etapas, fundamentalmente en la transcripción, pero también durante la traducción, el transporte y el ensamblamiento de las proteínas.

TRANSPORTE A TRAVES DE MEMBRANA

	Página
III.1. Procesos de transporte	15
III.2. Transporte de aminoácidos	16
III.2.1. Transporte de aminoácidos en <i>S. cerevisiae</i>	17
III.2.2. Regulación del transporte de aminoácidos	25
III.2.2.1. Represión por nitrógeno	26
III.2.2.2. Efecto activador de la glucosa	27
III.2.2.3. Requerimientos energéticos del transporte de aminoácidos	28
III.2.3. Transporte de GABA en <i>S. cerevisiae</i>	29
III.2.4. Transporte de ácido δ -aminolevúlico	31

III. TRANSPORTE A TRAVES DE MEMBRANA

III.1. Procesos de transporte

Existen tres tipos de procesos de transporte de solutos a través de la membrana plasmática. Estos son: difusión simple, difusión facilitada y transporte activo.

El proceso de difusión simple, raramente encontrado en células de levaduras, es gobernado por la ley de acción de masas. Como resultado las concentraciones intracelulares del metabolito que difunde nunca exceden las del medio externo y el proceso no es saturable con respecto a la concentración de sustrato. Además este proceso no se ve afectado por la temperatura o la presencia de inhibidores metabólicos.

El proceso de difusión facilitada es una variación del de difusión simple en el cual está involucrado un translocador de membrana. En este caso el metabolito tampoco se concentra intracelularmente ni es un proceso dependiente de energía. Se llega muy rápidamente, por lo general en segundos, a un equilibrio influjo-eflujo. Como hay una proteína de membrana involucrada, el proceso de incorporación es dependiente de la temperatura y saturable por el sustrato. La unión del compuesto a transportar es un pre-requisito para la difusión facilitada y, en

consecuencia, puede inhibirse competitivamente por análogos estructurales del sustrato. Además el transportador se puede inactivar como consecuencia de mutaciones.

El transporte activo es el proceso de incorporación más frecuentemente observado. Al igual que la difusión facilitada, el transporte activo es mediado por un transportador. Por ello, es un proceso dependiente de la temperatura, saturable por el sustrato y sensible a inhibición competitiva por sustratos análogos. Este transporte también puede inactivarse por mutaciones. La característica distintiva de este sistema de transporte es el requerimiento energético que permite la acumulación de metabolitos contra gradiente. El sustrato puede alcanzar concentraciones internas 25-30 veces mayores que las del medio externo (Cooper, 1982). Como consecuencia de su acoplamiento energético, los sistemas de transporte activos son sensibles a inhibidores del metabolismo energético.

III.2. Transporte de aminoácidos

La utilización de aminoácidos como fuente de nitrógeno o como componentes básicos de las proteínas implica su entrada a las células seguida ya sea por su incorporación a proteínas o por la eliminación enzimática del grupo α -amino por deaminación o transaminación.

Los sistemas de transporte de aminoácidos de microorganismos eucariotas poseen características tanto de los sistemas bacterianos, con una gran especificidad para un único aminoácido o un grupo reducido de aminoácidos estructuralmente relacionados, como de los sistemas de células de mamíferos, con una especificidad más amplia para aminoácidos estructuralmente relacionados. Así, los microorganismos eucariotas generalmente poseen dos tipos de sistemas de transporte para aminoácidos: sistemas específicos para un único aminoácido o una familia de aminoácidos estructuralmente relacionados y sistemas generales compartidos por un gran número de aminoácidos.

Sin embargo, los sistemas de transporte de microorganismos eucariotas difieren de los sistemas de bacterias y de células de mamíferos en por lo menos dos aspectos: i) median un flujo prácticamente unidireccional del medio externo al interior de las células, ii) sus actividades se regulan por un mecanismo de retroinhibición.

III.2.1. Transporte de aminoácidos en *S. cerevisiae*

El número de sistemas de transporte en la membrana plasmática de *S. cerevisiae* es sorprendentemente alto. En muchos casos un determinado sustrato es transportado por varias permeasas con diferentes afinidades, especificidades,

capacidades y regulaciones. Algunos aminoácidos son transportados por dos permeasas, una específica y la general de aminoácidos (GAP), pero otros, como metionina (Gits y Grenson, 1967), histidina (Crabeel y Grenson, 1970), ácido glutámico (Darte y Grenson, 1975), lisina (Grenson, 1966) y GABA (Grenson y col., 1987) se transportan por dos o tres sistemas específicos con valores de K_T y $V_{m\acute{a}x}$ muy diferentes. Con este conjunto de permeasas las células pueden captar aminoácidos presentes en un amplio rango de concentraciones.

Más aún, la multiplicidad y diversidad de transportadores permiten a la levadura acumular aminoácidos tanto para biosíntesis como para catabolismo bajo una muy amplia variedad de condiciones.

De todos estos sistemas, sólo algunos están presentes en forma permanente. Estos son las permeasas constitutivas. El resto de los sistemas, llamados adaptativos o inducibles, se expresan sólo bajo determinadas condiciones.

Debido a su parecido con los sustratos naturales de las permeasas, también son transportadas muchas sustancias que contienen nitrógeno, pero no son utilizadas como metabolitos.

Halvorson y Cohen (1958), propusieron la existencia de un sistema capaz de incorporar todos los aminoácidos. Surdin y col. (1965) fueron los primeros en aislar mutantes defectivas pleiotrópicamente en la incorporación de varios aminoácidos. Además llevaron a cabo un estudio detallado que demostró la amplia especificidad de un sistema de captación general de aminoácidos. Sin embargo, fueron Grenson y col. (1970) quienes presentaron las principales evidencias tanto bioquímicas como genéticas de la presencia de esa Permeasa General de Aminoácidos (GAP) en *S. cerevisiae*. Encontraron que en un medio con amonio como fuente de nitrógeno, crecían mutantes resistentes al análogo tóxico de la arginina, la canavanina, llamadas *can1*, que recuperaban la sensibilidad a canavanina en un medio conteniendo una fuente pobre de nitrógeno como es la prolina. Es decir que la canavanina se estaría incorporando por otro sistema regulable por la fuente de nitrógeno. Estos mismos autores (Grenson y col., 1970) también describieron otro tipo de mutantes (*gap1*), que tenían disminuída la capacidad de transportar aminoácidos básicos y neutros cuando crecían con prolina como fuente de nitrógeno, lo cual los llevó a la conclusión de que la levadura *S. cerevisiae* posee una GAP que se inhibe por iones amonio. Como las velocidades de incorporación de los aminoácidos ácidos y prolina no se afectaron por la mutación

gap1, propusieron que estos solutos no eran transportados por la GAP. Sin embargo, estudios posteriores demostraron que la GAP es capaz de transportar todos los aminoácidos incluyendo glutamato y aspartato (Darte y Grenson, 1975) y prolina (Lasko y Brandriss, 1981). La capacidad de este sistema de transportar D-enantiómeros (Rytka, 1975) lo distingue de los sistemas de transporte específicos que muestran una marcada preferencia por los isómeros L de los aminoácidos. Se demostró que la GAP es la principal ruta de entrada en *S. cerevisiae* de aminoácidos como glicina, alanina, fenilalanina, triptofano y tirosina (Greasham y Moat, 1973; Cooper, 1982).

La GAP es un complejo multiproteico formado por una proteína de membrana constituida por tres péptidos de 53000, 45000 y 30000 Daltons y una proteína periplasmática de 14000 Daltons (Woodward y Kornberg, 1980). Este último componente es esencial para el funcionamiento de la GAP y es responsable de la unión de los aminoácidos previa a su translocación a través de la membrana plasmática. Todavía no se conoce el mecanismo por el cual esta proteína interactúa con el complejo proteico de membrana.

En vista de la amplia especificidad de la GAP, y teniendo en cuenta que su actividad sólo se expresa de manera apreciable en células bajo ayuno de nitrógeno, parece

probable que el rol fisiológico de la GAP sea el de un secuestrador de aminoácidos. Luego de ser incorporados por este sistema, los aminoácidos ingresan en el metabolismo catabólico del nitrógeno, que ejerce así una influencia significativa sobre la actividad de la GAP.

Como ya se mencionó, la levadura *S. cerevisiae*, además de la GAP, posee varios sistemas de transporte de aminoácidos relativamente específicos descritos por primera vez también por Grenson y col. (1966). Probablemente, son estos sistemas, los que proveen los aminoácidos que serán incorporados a las proteínas ya que no sufren inhibición competitiva por otros aminoácidos (excepto por algunos pocos análogos).

Grenson y col. (1966) encontraron que la incorporación de L-arginina ocurre a través de un translocador de alta especificidad con un K_T de 10 μM . También se observó que el transporte de L-arginina se inhibe competitivamente por L-lisina, L-ornitina y L-canavanina. De ello surge que este sistema transportador participaría en la incorporación de todos los aminoácidos básicos y estaría constituido por un único gen (CAN1) cuya secuencia ya fue determinada por Hoffmann (1985). Además de este sistema de alta afinidad, la L-arginina es transportada por un sistema

de baja afinidad con un K_T de 100 μM (Chan y Cossins, 1976; Keenan y Rose, 1979).

El transporte de L-lisina también está mediado por dos sistemas distintos (Grenson, 1966; Kotyk y col., 1971; Keenan y col., 1982). El de baja afinidad (K_T 200 μM), es el mismo sistema para el transporte de aminoácidos básicos y consecuentemente está ausente en las mutantes *can1*. El sistema de alta afinidad (K_T 25 μM), depende de un translocador específico, producto del gen LYP1 (Grenson, 1966).

S. cerevisiae tiene un sistema de transporte específico para L-histidina con un K_T de 20 μM (Crabeel y Grenson, 1970).

Gits y Grenson (1967) y Kotyk y col. (1971) demostraron la existencia de dos componentes relacionados con el transporte de L-metionina, uno de alta (K_T 3-2 μM) y el otro de baja afinidad (K_T 600-800 μM); el primero es producto del gen METP y el segundo también funciona para el transporte de los aminoácidos L-serina y L-treonina (Gits y Grenson, 1967). Sin embargo más tarde, Verma y col. (1984) demostraron que la serina tiene además un sistema específico cuya actividad depende del estado del metabolismo celular del nitrógeno. Calderbank y col. (1984) calcularon los K_T de los sistemas de transporte de L-serina y L-treonina, que

resultaron 580 y 210 μM respectivamente. Por otro lado, también Gregory y col. (1982) sugirieron que estos dos aminoácidos podrían no compartir el mismo translocador, ya que la L-treonina pero no la L-serina, inhibe competitivamente la incorporación de L-asparagina.

La L-cisteína se incorpora en levaduras mediante un sistema con un K_r de 250 μM (Kotyky y col., 1971).

Bussey y Umbarger (1970 a, b) fueron los primeros en demostrar la existencia de un sistema de transporte específico para leucina en *S. cerevisiae*; en tanto que Kotyky y col. (1971) y Ramos y col. (1980) identificaron dos componentes responsables de este transporte (K_r 30 μM y 2.0-4.5 mM).

Kotyky y col. (1971) y Darte y Grenson (1975) identificaron dos sistemas de transporte específicos para aminoácidos dicarboxílicos como el glutámico con K_r 20 μM y 3.3 mM determinados por Calderbank y col. (1984).

La incorporación de L-asparagina se realiza a través de un translocador relativamente específico (K_r 350 μM) (Gregory y col., 1982), que también pueden utilizar L-glutamina, L-histidina, L-treonina y L-triptofano, pero no L-aspartato. Grenson y Dubois (1982) demostraron que, además del sistema de transporte específico de L-asparagina y L-

glutamina, esta última puede incorporarse asimismo mediante otro sistema de baja afinidad.

Magna-Schwencke y Schwencke (1969) fueron los primeros en estudiar la cinética del transporte de L-prolina en *S. cerevisiae*. Estos autores demostraron que en condiciones de ayuno de nitrógeno, las células pueden acumular L-prolina por medio de un sistema de transporte específico (K_T 25 μ M). Lasko y Brandriss (1981) aislaron mutantes *put4* defectivas en el transporte de prolina. Por otro lado, hay evidencias de que la L-prolina también se incorpora por la GAP y por el sistema de transporte de aminoácidos básicos (Cooper, 1982).

Existen dos componentes cinéticamente distintos involucrados en el transporte de L-alanina y L-glicina (Eddy y col., 1970; Kotyk y Rihová, 1972; Ballarin-Denti y col., 1984; Calderbank y col., 1985). La GAP es responsable de la incorporación de alta afinidad; pero se desconoce tanto la especificidad como el rol fisiológico de el o los sistemas.

A pesar de que los sistemas de transporte de aminoácidos en *S. cerevisiae* parecerían operar por lo menos desde el punto de vista cinético, independientemente unos de otros, hay evidencias de que podrían tener elementos en común. Roon y col. (1977 a, b) aislaron mutantes (*amt⁺*) defectivas en el transporte de amonio y aminoácidos. El

hallazgo de que esta mutación afecta tanto a la GAP como a sistemas específicos sugiere la posibilidad de que distintos translocadores compartan uno o más componentes. Por otro lado, Banerjee y col. (1984) aislaron una mutante de *S. cerevisiae* sensible a la temperatura, que a temperatura restrictiva es defectiva pleiotrópicamente en el transporte de aminoácidos. La incapacidad de esta mutante para acumular aminoácidos se debe a una disminución en la actividad de la fosfofructoquinasa. Esto produce una disminución en la formación de ATP, lo que lleva a una disminución de la actividad de los sistemas de transporte que dependen de energía. No se puede descartar que un fenómeno similar sea el responsable del comportamiento fenotípico de la mutante *amt⁺*.

III.2.2. Regulación del transporte de aminoácidos

Los mecanismos de control responsables de la regulación de los sistemas de transporte de aminoácidos en *S. cerevisiae* no se conocen completamente.

Sin embargo, se sabe que en la mayoría de estos sistemas actúan mecanismos de retroinhibición (Wiame y col., 1984). Esto significa que si un compuesto puede ser transportado por un sistema dado, puede también inhibir ese

mismo sistema una vez que su concentración intracelular es suficientemente alta.

Por otro lado, también se sabe que un buen número de los sistemas de transporte están sometidos a represión por nitrógeno (Wiame y col., 1984).

III.2.2.1. Represión por nitrógeno

Un gran número de sistemas de transporte de aminoácidos en *Saccharomyces cerevisiae*, entre ellos la GAP, está regulado por la fuente de nitrógeno.

En el mecanismo de regulación de la GAP están involucrados dos procesos diferentes. Primero, la GAP es inhibida progresiva y completamente por el agregado de iones amonio al medio de crecimiento (Grenson, 1983 a). Inicialmente esta inhibición es reversible. Luego ocurre la inhibición de su síntesis a nivel de la transcripción y/o traducción del gen GAP1 o a nivel de algún evento post-transcripcional necesario para la formación de la proteína activa GAP (Wiame y col., 1984; Grenson, 1983 a, b).

Menos aún se sabe acerca de la regulación de los sistemas de transporte específicos de aminoácidos en *S. cerevisiae*. Sin embargo, muchos autores suponen que la mayoría de estos sistemas no están regulados por represión metabólica. Excepciones conocidas incluyen el sistema de

alta afinidad específico para L-prolina (Grenson, 1983 a, b) que parecería sufrir el mismo tipo de regulación descripto para la GAP y el del sistema de transporte específico L-asparagina/L-glutamina (Grenson y Dubois, 1982). Finalmente, se ha demostrado que la síntesis del translocador específico para L-glutamina así como el transporte de L-serina (Verma y col., 1984) se reprimen por la presencia de iones amonio (Darte y Grenson, 1975; Wiame y col., 1984).

III.2.2.2. Efecto activador de la glucosa

La glucosa activa varios sistemas de transporte en levaduras, entre ellos los sistemas de transporte de iones (Borst-Pauwels, 1981), aminoácidos (Foury y Goffeau, 1975; Ramos y col., 1977), amonio (Roon y col., 1975), inositol (Nikawa y col., 1982) y nucleótidos (Foury y Goffeau, 1975). Todos estos procesos requieren un gradiente de protones (Eddy, 1978), de manera que la activación de la bomba H⁺-ATPasa explicaría el efecto general de la glucosa a nivel de la incorporación de nutrientes. Se obtuvieron evidencias de esta activación tanto *in vivo* (Serrano, 1980; Kotyk y col., 1982) como *in vitro* (Serrano, 1983) donde se mostró que la glucosa activa el eflujo de protones desde las células.

III.2.2.3. Requerimiento energético del transporte de aminoácidos

Está ampliamente aceptado que el transporte activo de aminoácidos en levaduras involucra el co-transporte de protones (Eddy, 1982). El gradiente electroquímico de protones a través de la membrana plasmática, necesario para el transporte de los aminoácidos, es producido por la H⁺-ATPasa (Serrano, 1984). Así, tanto el funcionamiento de los sistemas específicos de transporte de aminoácidos como el de la GAP involucran un mecanismo de movimiento opuesto de protones ("symport"). Seaston y col. (1973) establecieron una estequiometría protón:aminoácido 1:1 para la acumulación de L-prolina, L-metionina y L-arginina vía sus sistemas específicos. En 1986, Horák y Kotyk encontraron que aparentemente no existe una relación entre el gradiente de protones y la incorporación de L-prolina en *S. cerevisiae*. Sin embargo, estos autores no descartaron la posibilidad de que la incorporación de este aminoácido se produzca mediante un mecanismo de contra-movimiento de protones ("symport"), mientras que enfatizaron la importancia de gradientes de pH locales, cuyos valores podrían ser diferentes a los medidos considerando una distribución uniforme de protones dentro de las células.

Por otro lado, estudiando el transporte de glicina, se observó una compensación de carga por el ión potasio (Eddy, 1982). Es decir que la acumulación de aminoácidos puede estar impulsada por dos gradientes combinados: el de protones y el de potasio en direcciones opuestas a través de la membrana plasmática (Horák, 1986).

III.2.3. Transporte de GABA en *S. cerevisiae*

Las células de *S. cerevisiae* son capaces de utilizar el ácido γ -aminobutírico (GABA) como única fuente de nitrógeno (Pietruszko y Fowden, 1961). La utilización de este nutriente ocurre a través de las siguientes reacciones:



El paso (1) es catalizado por la enzima γ -aminobutirato:2-oxoglutarato aminotransferasa y el paso (2) por la succinato semialdehído (SSA) deshidrogenasa. Estas enzimas están codificadas por los genes UGA1 y UGA2, respectivamente (Ramos y col., 1985).

El transporte de GABA puede estar mediado por tres permeasas: la permeasa general de aminoácidos, GAP1, la permeasa específica para prolina, PUT4, y una permeasa

específica para GABA, UGA4 (Grenson y col., 1987). La expresión de los genes UGA1, UGA2 y UGA4 es inducida en presencia de GABA. Esta inducción requiere dos factores de control positivo, codificados por los genes UGA3 y UGA35 (Ramos y col., 85; Vissers y col., 1989). También se ha identificado un factor regulatorio negativo codificado por el gen UGA43, que actúa sobre la expresión del gen UGA4 pero no tiene efecto sobre las enzimas del catabolismo del GABA (Vissers y col., 1989). Análisis moleculares del gen UGA3 mostraron que codifica para una proteína con las características típicas de las proteínas que se unen al DNA (André, 1990). Vissers y col. (1990) propusieron que el factor UGA35 actúa junto con la proteína UGA3 activada por GABA, estimulando la transcripción de los genes UGA1, UGA2 y UGA4.

En 1990, McKelvey y colaboradores caracterizaron bioquímicamente el transporte de GABA en *S. cerevisiae*. Estos autores, a diferencia de Grenson y col. (1987), detectaron sólo dos sistemas de transporte con valores de K_t de 12 y 100 μM . También determinaron que el transporte es máximo a pH 5.0, es dependiente de energía, y aparentemente está sujeto a diferentes tipos de regulación.

III.2.4. Transporte de ácido δ -aminolevulínico

Poco se conoce acerca del transporte del ácido δ -aminolevulínico (ALA) a través de membrana. Se han publicado algunos estudios en diversos organismos, sin embargo, este tema no ha sido investigado en *S. cerevisiae*, un organismo eucariótico simple ampliamente utilizado como modelo experimental.

En túbulo proximal de riñón de rata, el ALA sufre transporte concentrativo compartido, por lo menos en parte, con el ácido p-aminohipúrico (Cheeks y Wedeen, 1986).

Bradyrhizobium japonicum (Sangwan y O'Brian, 1991) y *Rhizobium leguminosarum* (Herrada y col., 1992) son capaces de incorporar ALA de su entorno, tanto en sus formas de vida libre como en su forma de vida simbiótica. Este proceso es mediado principalmente por el sistema de transporte del malato.

En cambio, tanto en *Escherichia coli* (Verkamp y col., 1993) como en *Salmonella typhimurium* (Elliot, 1993) el ALA es transportado a través de membrana por la permeasa de dipéptidos, probablemente debido a su relación estructural con el dipéptido glicil-glicina.

Cepas de la levadura *S. cerevisiae* deficientes en la actividad de ALA-Sintetasa son capaces de crecer utilizando el precursor de las porfirinas, ALA, presente en el medio de

cultivo (Woods y col., 1975; Mattoon y col., 1978) que necesariamente atraviesa la membrana.

Si bien el camino biosintético de las porfirinas y su regulación han sido muy estudiados, en levaduras nada se sabe del proceso de incorporación de ALA y, como ya hemos indicado antes, tampoco hay demasiada información acerca de este proceso en otros organismos.

MATERIALES Y METODOS

CAPITULO I

MATERIALES

	Página
I.1. Cepas	33
I.2. Reactivos	35

I. MATERIALES

I.1. Cepas

En este trabajo se utilizaron las siguientes cepas haploides de *Saccharomyces cerevisiae* provistas generosamente por el Profesor Dr. James Mattoon de la Universidad de Colorado, Colorado Springs, USA.

Cepa	Genotipo
D27	MATa <i>mal met</i>
D27/C6	MATa <i>met HEM R⁺ Cu^R</i>
WR3-R1	MATa <i>leu2 ura3 hem1 his3 ade2</i>
WR3-R3	MATa <i>leu2 ura3 hem1 his3 ade2</i>
MA24-RS21	MATa <i>leu2-3 hem1 can^R ade1</i>
BR13-10C	MATa <i>hem1 MAL6</i>
W1	MATa <i>hem1 mal</i>

La cepa D27, derivada de la cepa normal D273-10B, es normal en la síntesis de hemo. La cepa D27/C6 deriva de la D27 y es portadora del gen recesivo HEM R⁺. Los espectros de células enteras, realizados y facilitados por el Profesor Dr. J. Mattoon, muestran que las células de la mutante HEM R⁺ contienen 2 veces más citocromos por unidad de peso seco que las de la cepa normal D27, cuando crecen en un medio con

una fuente de carbono no fermentable (glicerol 3%) (Figura I.1). Todos los citocromos se vieron afectados en igual grado.

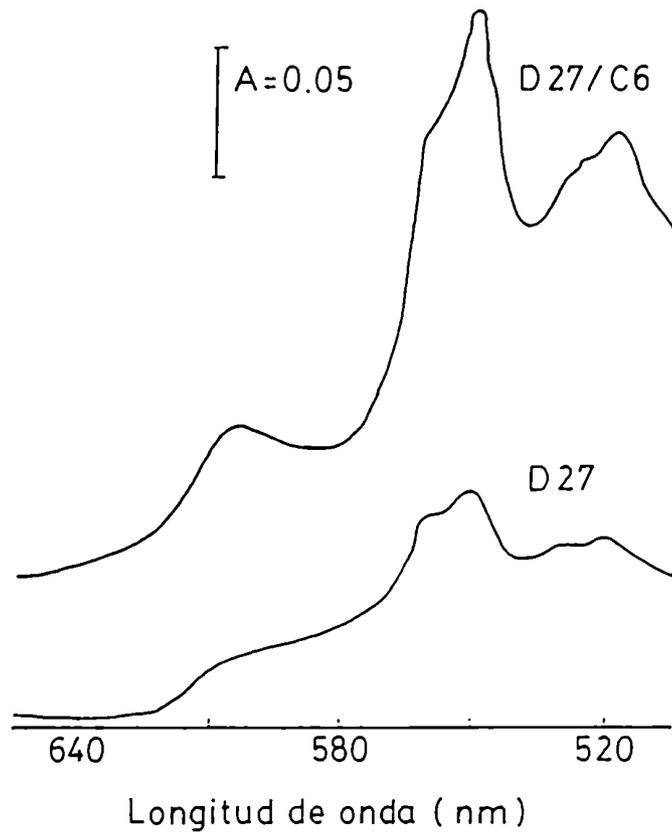


Figura I.1: Espectros de las células enteras de las cepas D27 y D27/C6. Las células se dejaron crecer 48 horas en medio con glicerol. Se empleó una suspensión celular de 25 mg peso seco/ml y una solución de leche 20% como referencia de turbidez. Esta Figura fue generosamente cedida por el Dr. J.R. Mattoon.

La cepa MMY2 (*MATa ura3*), provista por Chang S. Park (Oriental Brewery, Korea), se utilizó por su gran sensibilidad a D-histidina en un medio conteniendo prolina como única fuente de nitrógeno.

También se utilizó la mutante MMY2/H3 (*MATa gap1 ura3*) aislada a partir de la MMY2 y seleccionada por su resistencia a D-histidina como fue descrito por Rytka (1975) (Kotliar y col., 1994).

La cepa *gap1* de referencia 2512c (*MATa gap1*) se obtuvo del Yeast Genetics Stock Center (University of California, Berkeley).

I.2. Reactivos

El ácido δ -[4- ^{14}C]-aminolevúlico (^{14}C -ALA) y el ácido γ -[2,3- ^3H (N)]-aminobutírico (^3H -GABA) fueron de New England Nuclear.

El extracto de levadura, la peptona y el agar fueron obtenidos de Difco, la dextrosa de Mallickrodt y los demás reactivos utilizados provenían de Merck o de Sigma Chem. Co., USA.

METODOS

	Página
II.1. Cultivo y crecimiento de las células	36
II.1.1. Curvas de crecimiento	37
II.2. Ensayo de incorporación de ^{14}C -ALA	38
II.3. Ensayo de incorporación de ^3H -GABA	39
II.4. Determinación de parámetros cinéticos	39
II.5. Recuperación y análisis del ^{14}C acumulado en las células	40
II.6. Recuperación y análisis del ^3H acumulado en las células	41
II.7. Salida y desplazamiento de ALA intracelular	41
II.8. Determinación del pH óptimo	42
II.9. Ensayos de inhibición de la incorporación	42
II.10. Obtención de la proteína enzimática	42
II.11. Sistemas standard de incubación	43
II.11.1. ALA-Sintetasa	43
II.11.2. ALA-Dehidrasa	44
II.12. Determinación de ALA	44

	Página
II.13. Determinación de PBG	45
II.14. Determinación del contenido proteico	46
II.15. Determinación de ALA intracelular	47
II.16. Obtención de protoplastos	47
II.17. Shock osmótico	48

II. METODOS

II.1. Cultivo y crecimiento de las células

Se emplearon los siguientes medios complejos de crecimiento celular:

i. YPD: extracto de levadura 1%, peptona 2% y dextrosa 2% en agua destilada.

ii. YPD 0.3%: extracto de levadura 1%, peptona 2% y dextrosa 0.3% en agua destilada.

Los medios mínimos utilizados fueron los descritos originariamente por Vavra y Johnson (1956) con algunas modificaciones. Un litro contenía: 0.4 mg biotina, 10 mg pantotenato de calcio, 200 mg mio-inositol, 88 mg tiamina.HCl, 24 mg piridoxina.HCl, 5 mg nicotinamida, 17.4 mg $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, 1 mg $CuSO_4 \cdot 5H_2O$, 7.3 mg $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 1 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 4 g KH_2PO_4 y 12 g NaH_2PO_4 . La fuente de nitrógeno fue $(NH_4)_2SO_4$ 10 mM para el Medio Mínimo Amonio (MAM), L-prolina 10 mM para el Medio Mínimo Prolina (MPM) o GABA 5 mM para el Medio Mínimo GABA (MGABAM). La fuente de carbono fue etanol 3% (Et), glicerol 3% (Gli) o glucosa 0.3% (Gluc).

Para el mantenimiento de las células se realizaron repiques periódicos. Las células se dejaron crecer en estufa

a 28-30°C durante 40-48 horas en tubos de YPD agar inclinado y luego se guardaron a 4°C hasta el momento de su uso.

Cada vez que se utilizaron medios mínimos de crecimiento, se preparó un cultivo de medio YPD 0.3% a partir del sólido. De este cultivo se sembró un precultivo de medio mínimo que luego se utilizó como inóculo del cultivo empleado en la experiencia.

Todos los cultivos líquidos se crecieron en condiciones aeróbicas con agitación constante a 28-30°C.

Las células se cosecharon por centrifugación a 12000 x g durante 10 minutos en una centrífuga refrigerada y se lavaron dos veces con agua destilada. Las células de levadura así obtenidas se utilizaron inmediatamente para los ensayos de transporte o se guardaron a -20°C hasta el momento de su empleo, en el caso de las determinaciones enzimáticas.

II.1.1. Curvas de crecimiento

Para realizar las curvas de crecimiento las células se dejaron crecer durante 40-50 horas, sacando alícuotas cada hora para determinar la densidad óptica del cultivo a 570 nm. Los tiempos de generación se calcularon a partir de las curvas de crecimiento, usando los valores de densidad

como medida del número de células. Se aplicó la siguiente expresión.

$$G = \frac{0.69315 t}{\ln (D/D_0)}$$

donde,

G: tiempo de generación

t: tiempo

D: densidad a 570 nm a tiempo t

D₀: densidad a 570 nm a tiempo cero

II.2. Ensayo de incorporación de ¹⁴C-ALA

Se incubaron 5 mg peso húmedo de células/ml a 30°C con agitación constante en buffer ftalato ácido de potasio (FHK) 20 mM, pH 5.0, conteniendo ¹⁴C-ALA 0.05 mM o 1.0 mM. A los tiempos indicados en cada caso, se extrajeron muestras de 0.2 ml, las cuales se colocaron en filtros S&S 3362 y luego se lavaron tres veces con 2 ml de buffer FHK 20 mM mantenido en baño de hielo. El tiempo requerido para tomar las muestras, filtrar y lavar no superó los 5 segundos. Los filtros secos se transfirieron a viales conteniendo 5 ml de líquido de centelleo (2.5 g 2.5-difeniloxazol (PPO) y 50 mg 1.4-bis-5-fenil-2-oxazolilbenceno (POPOP) por litro de

tolueno) y la radiactividad se midió en un contador de centelleo líquido Tracor Analytic Delta 300.

Para calcular la concentración de ALA interna se consideró el contenido celular de agua igual a 2.00 $\mu\text{l}/\text{mg}$ peso húmedo de células (Cooper, 1982).

En cada experimento, realizado por triplicado, todas las mediciones se hicieron por duplicado.

II.3. Ensayo de incorporación de ^3H -GABA

La metodología utilizada para la medición de la incorporación de ^3H -GABA fue la misma ya descrita en II.2 para la incorporación de ^{14}C -ALA. La concentración de ^3H -GABA utilizada durante la incubación fue 1.0 mM.

II.4. Determinación de parámetros cinéticos

Para determinar la velocidad inicial de incorporación de ALA se tomaron muestras a 0, 1.5 y 3 minutos de la manera descrita anteriormente. Las velocidades se calcularon a partir de la pendiente de la regresión lineal para cada concentración externa de ALA.

II.5. Recuperación y análisis del ^{14}C acumulado en las células

Luego de incubar las células con ^{14}C -ALA como se indicó anteriormente, se tomaron muestras de 0.5 ml a 10, 15 y 30 minutos, que inmediatamente se diluyeron con 0.5 ml de buffer ftalato de potasio 20 mM mantenido en baño de hielo. Las suspensiones se centrifugaron enseguida en una centrífuga Eppendorf. Las células se lavaron dos veces con el mismo buffer. Se realizó una extracción de aminoácidos incubando las células durante una hora con 0.5 ml de una solución de metanol:agua (9:1). Para diferenciar la marca soluble en metanol de la no soluble, se centrifugó y se separó el pellet celular del sobrenadante metanólico. En ambas fracciones se midió radiactividad. Para verificar que la marca soluble pertenecía al ALA, se realizó una cromatografía de los sobrenadantes previamente concentrados, en papel Whatmann nº1. El solvente de corrida utilizado fue la mezcla n-butanol:ácido acético:agua (25:4:10). La cromatografía se corrió durante 5 horas aproximadamente. Luego, el papel se dejó secar y se reveló con ninhidrina 2% en acetona para observación visual. La ninhidrina, al reaccionar con ALA da una coloración típica amarilla, mientras que con α -aminoácidos la coloración es azul violáceo. El papel se cortó en rectángulos de 1.5 x 1.0 cm a

los que se les determinó radiactividad. Para determinar la radiactividad presente en los pellets, éstos fueron resuspendidos en 0.2 ml de agua destilada y se colocó esta suspensión en 5 ml de líquido de centelleo Bray (1960).

II.6. Recuperación y análisis del ^3H acumulado en las células

La metodología utilizada fue la ya descrita en II.5 para la recuperación y análisis del ^{14}C acumulado. En este caso el solvente de corrida utilizado en la cromatografía fue la mezcla isopropanol:hidróxido de amonio (7:3).

II.7. Salida y desplazamiento de ALA intracelular

Las células cosechadas y lavadas se resuspendieron en buffer FHK 20 mM pH 5.0 conteniendo ^{14}C -ALA 1 mM y se incubaron a 30°C durante una hora con agitación constante. Luego se centrifugó y las células se lavaron dos veces. Las células libres de marca no incorporada se resuspendieron, por un lado en buffer FHK 20 mM pH 5.0, para medir salida, y por otro, en buffer FHK 20 mM pH 5.0 conteniendo 1 mM de ALA frío, para medir desplazamiento.

Se incubó a 30°C con agitación y se sacaron muestras a los tiempos indicados. Estas muestras se centrifugaron en

una centrífuga Eppendorf y se determinó radiactividad tanto en el pellet como en el sobrenadante.

II.8. Determinación del pH óptimo

Para determinar el pH óptimo se midió la incorporación de ^{14}C -ALA luego de 5 minutos de incubación en las condiciones ya descritas.

II.9. Ensayos de inhibición de la incorporación

Los ensayos de inhibición de la incorporación se llevaron a cabo utilizando el sistema de medición ya descrito pero en presencia de una concentración del compuesto analizado 10 veces mayor a la de ALA. El inhibidor y el sustrato radiactivo se agregaron al mismo tiempo.

Para determinar la dependencia energética del sistema del ALA se agregaron diferentes inhibidores del metabolismo energético al sistema de incubación.

En ambos casos se tomaron las muestras luego de 5 minutos de incubación.

II.10. Obtención de la proteína enzimática

Las células lavadas se resuspendieron en buffer Tris-HCl 50 mM pH 7.8 (g peso húmedo de células:ml buffer,

1:1), se sonicaron en amplitud 12 μ durante 2 minutos en presencia de arena (g peso húmedo de células:g arena, 1:3) y luego la relación g peso húmedo de células:ml de buffer se llevó a 1:2. El homogenato resultante se centrifugó a 23000 x g durante 20 minutos obteniéndose un sobrenadante y un precipitado. Este sobrenadante se empleó como fuente de ALA-Dehidrasa (ALA-D). La fracción en la que se determinó actividad de ALA-Sintetasa (ALA-S) se obtuvo por centrifugación del homogenato a 2300 x g 10 minutos; el buffer de suspensión empleado en este caso fue Tris-HCl 50 mM pH 7.4.

II.11. Sistemas standard de incubación

II.11.1. ALA-Sintetasa

La actividad de ALA-S se midió de acuerdo al método de Marver y col. (1966). La mezcla de incubación contenía: 0.5 ml de preparación enzimática, glicina 100 mM, EDTA 10 mM, buffer Tris-HCl 75 mM pH 7.4 y agua destilada hasta completar un volumen final de 2 ml. La incubación se realizó aeróbicamente, en oscuridad con agitación, a 37°C durante 1 hora. La reacción se detuvo por agregado de tricloroacético (TCA) 25%. Las proteínas precipitadas se separaron por

centrifugación y en el sobrenadante se cuantificó el ALA formado.

II.11.2. ALA-Dehidrasa

El sistema de incubación standard fue el descrito por Correa García y col. (1993). Contenía: 0.5 ml de preparación enzimática, ALA 5 mM y buffer Tris-HCl 50 mM pH 7.8 hasta completar un volumen final de 1 ml. Las incubaciones se realizaron en oscuridad y aerobiosis a 30°C durante 1 hora. Luego se agregó TCA hasta una concentración 5% (v/v). El precipitado proteico se descartó y el PBG formado se determinó en el sobrenadante.

Se hicieron blancos de enzima, sin agregar ALA al sistema de incubación, los cuales se emplearon para corregir los resultados.

II.12. Determinación de ALA

La cuantificación de ALA se realizó por el método de Mauzerall y Granick (1956) como describen Moore y Labbe (1964). A una alícuota del sobrenadante de incubación se le agregó buffer acético-acetato 1 M pH 4.6 y acetilacetona, y se realizó la condensación a 80°C durante 10 minutos para obtener el ALA-pirrol. Luego de enfriar, se agregó igual

volumen de reactivo de Ehrlich modificado (p-dimetilaminobenzaldehído 2% (p/v), 84 ml de ácido acético glacial y 16 ml de ácido perclórico), se dejó reaccionar durante 8 minutos y se leyó la absorbancia a 553 nm. La cantidad de ALA se calculó utilizando la siguiente ecuación:

$$\text{nmoles ALA/ml enzima} = \frac{A_{553} \times 10^3 \times V_r \times d}{\epsilon \times V_{enz}}$$

donde,

A_{553} : absorbancia a 553 nm

d: factor de dilución por agregado de buffer en condensación

V_r : volumen luego de desproteínizar la mezcla de incubación

ϵ : 7.2×10^6 (coeficiente de extinción molar)

V_{enz} : volumen de enzima incubado

II.13. Determinación de PBG

La cantidad de PBG se determinó espectrofotométricamente empleando el reactivo de Ehrlich modificado (Mauzerall y Granick, 1956). A una alícuota del sobrenadante se le agregó igual cantidad del reactivo y a los 8 minutos se leyó la absorbancia a 553 nm. El contenido de PBG se calculó aplicando la siguiente expresión:

$$\text{nmoles PBG/ml enzima} = \frac{A_{553} \times V_f \times 10^6}{\epsilon \times \text{PM} \times V_{\text{enz}}}$$

donde,

A_{553} : absorbancia a 553 nm

V_f : volumen final de incubación

ϵ : 116 (absorbancia de una solución de PBG de concentración 1 mg/ml)

PM: 226 (peso molecular del PBG)

V_{enz} : volumen de enzima incubado

II.14. Determinación del contenido proteico

El contenido proteico de las preparaciones enzimáticas se determinó empleando el método descrito por Bradford (1976). A 0.1 ml de una dilución apropiada de la proteína en buffer Tris-HCl se le agregan 2.5 ml de una solución compuesta por 0.01% (p/v) de Coomassie Brilliant Blue G-250, 4.7% de etanol (95%) y 8.5% (p/v) de ácido fosfórico (85%). Se puede medir la absorbancia a 595 nm, luego de transcurridos 10 minutos, contra un blanco preparado con 0.1 ml de buffer y 2.5 ml del reactivo. El color se mantiene durante 60 minutos.

La cantidad de proteína se calcula aplicando la siguiente expresión:

$$\text{mg proteína/ml} = A_{595} \times f \times \text{dilución}$$

donde f se determina por medio de una curva de calibración realizada empleando soluciones de seroalbúmina bovina en buffer Tris-HCl 50 mM pH 7.8.

II.15. Determinación de ALA intracelular

El ALA intracelular se determinó empleando la metodología descrita por Malamud y col. (1979). A 25 mg de peso seco de células se le agregaron 1.55 ml de TCA 5% y la suspensión se agitó en vortex durante 5 minutos. El precipitado se descartó luego de centrifugar a 1000 x g 20 minutos y en una alícuota del sobrenadante se determinó la concentración de ALA intracelular por el método de Mauzerall y Granick (1956) modificado por Moore y Labbe (1964).

II.16. Obtención de protoplastos

El equivalente a 0.1-0.2 ml de células se lava dos veces con buffer TE (Tris-HCl 10 mM + EDTA 1 mM pH 7.5). Las células se resuspenden en 0.3 ml de una solución de buffer TE conteniendo sorbitol 0.9 M, DTT 10 mM y cantidades distintas de unidades enzimáticas de Glusulasa, Helicasa

(reactifs IBF) y β -Glucuronidasa (SIGMA), el sistema se incuba a 37°C durante tiempos variables. La formación de protoplastos se sigue mediante la observación microscópica de células resuspendidas en agua o sorbitol 1 M.

II.17. Shock osmótico

Se resuspende 1 g de peso húmedo de células en 30 ml de una solución hipertónica (Tris-HCl 5 mM pH 7.5 conteniendo manitol 0.8 M, β -mercaptoetanol 2 mM y EDTA 0.5 mM) y se incuba 10 minutos a 30°C con agitación vigorosa. Se centrifuga a 6000 x g durante 7 minutos y las células se resuspenden rápidamente en 30 ml de solución hipotónica fría (MgCl₂ 0.5 mM). Se incuba 10 minutos en hielo y se centrifuga nuevamente. Los sobrenadantes corresponden a los fluidos del shock osmótico. Los pellets lavados corresponden a las células shockeadas.

RESULTADOS

TRANSPORTE DE ALA

	Página
I.1. Curvas de crecimiento	49
I.2. Entrada e incorporación de ALA	50
I.2.1. Medios complejos	50
I.2.2. Medios mínimos	53
I.3. Recuperación y análisis del ^{14}C acumulado	58
I.4. Salida y desplazamiento de ALA acumulado	60
I.5. Lavado de las muestras	61
I.6. Determinación del pH óptimo	63
I.7. Inhibidores del metabolismo energético	64
I.8. Especificidad del sistema transportador de ALA	66
I.9. Parámetros cinéticos	70
I.10. Caracterización y función de grupos sulfhidrilos en la proteína translocadora	76
I.11. Determinación de la actividad de las enzimas que sintetizan y consumen ALA	77
I.11.1. ALA-Sintetasa	78
I.11.2. ALA-Dehidrasa	80
I.11.3. ALA intracelular	81

	Página
I.12. Incorporación de ALA en células crecidas en presencia de ALA	82
I.13. Transporte de PBG	84
I.14. Conclusiones	86

I. TRANSPORTE DE ALA

I.1. Curvas de crecimiento

Las células de cepas silvestres de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* son aeróbicas facultativas, es decir que pueden fermentar glucosa u otros carbohidratos anaeróbicamente hasta etanol (fermentación alcohólica) o pueden crecer aeróbicamente utilizando varias fuentes de carbono; en este último caso obtienen su energía a través del ciclo de los ácidos tricarboxílicos.

Es importante conocer la curva de crecimiento de una cepa dada, ya que el estado fisiológico de las células varía con la etapa y el medio de crecimiento.

Se realizaron las curvas de crecimiento de las cepas utilizadas en los diferentes medios de cultivo empleados. En la Tabla I.I se presentan los tiempos de generación calculados a partir de dichas curvas. Estos valores son similares a los hallados para cepas silvestres crecidas en estas condiciones.

Tabla I.I: Tiempos de generación (G)

	G (min)	
	D27	D27/C6
YPD	160	140
YPEt	240	300
MPM-Et	300	360
MPM-Gli	660	720
MPM-Gluc	360	420
MAM-Et	240	300
MAM-Gli	540	600
MAM-Gluc	240	240

Los tiempos de generación fueron calculados como se indica en Materiales y Métodos.

I.2. Entrada e incorporación de ALA

I.2.1. Medios complejos

Se estudió la captación de ALA en las cepas D27 y D27/C6 crecidas en medios complejos.

Como aún no se conocían las propiedades de este sistema de transporte, se emplearon dos concentraciones distintas de ALA externo, del orden de aquellas utilizadas para sistemas de transporte ya caracterizados, como el de GABA (McKelvey y col., 1990) y los de α -aminoácidos como lisina (Grenson, 1966; Larimore y Roon, 1978; Larimore y col., 1980), leucina (Bussey y Umbarger, 1970; Ramos y col., 1975, 1980), metionina (Mau, 1963; Gits y Grenson, 1967), arginina (Grenson y col., 1966; Chan y Cossins, 1976;

Larimore y Roon, 1978; Whelan y col., 1979; Larimore y col., 1980) e histidina (Crabeel y Grenson, 1970).

En la Figura I.1 se muestra la entrada de ALA en células de las cepas D27 y D27/C6, crecidas en medios complejos con fuente de carbono fermentable (YPD) y no fermentable (YPEt).

Mientras que la incorporación de ALA en células crecidas en YPEt es lineal durante los 10 minutos de incubación, en células crecidas en YPD (glucosa 2%) casi no se detecta acumulación de ALA.

Es decir que en ambas cepas la incorporación de ALA está fuertemente influenciada por la fuente de carbono.

Se han realizado numerosos estudios acerca de la represión por catabolito del camino biosintético de las porfirinas (Polakis y Bartley, 1965; Jayaraman y col., 1972; Perlman y Mahler, 1974; Labbe-Bois y Volland, 1977; Borralho y col., 1983). Incluso recientemente, Correa García y col. (1993) demostraron y confirmaron la acción regulatoria de la glucosa (2%) sobre las dos primeras enzimas de esta ruta metabólica en estas mismas cepas.

Se observa entonces que la incorporación de ALA a las células parecería sufrir una regulación semejante a la de su posterior metabolización.

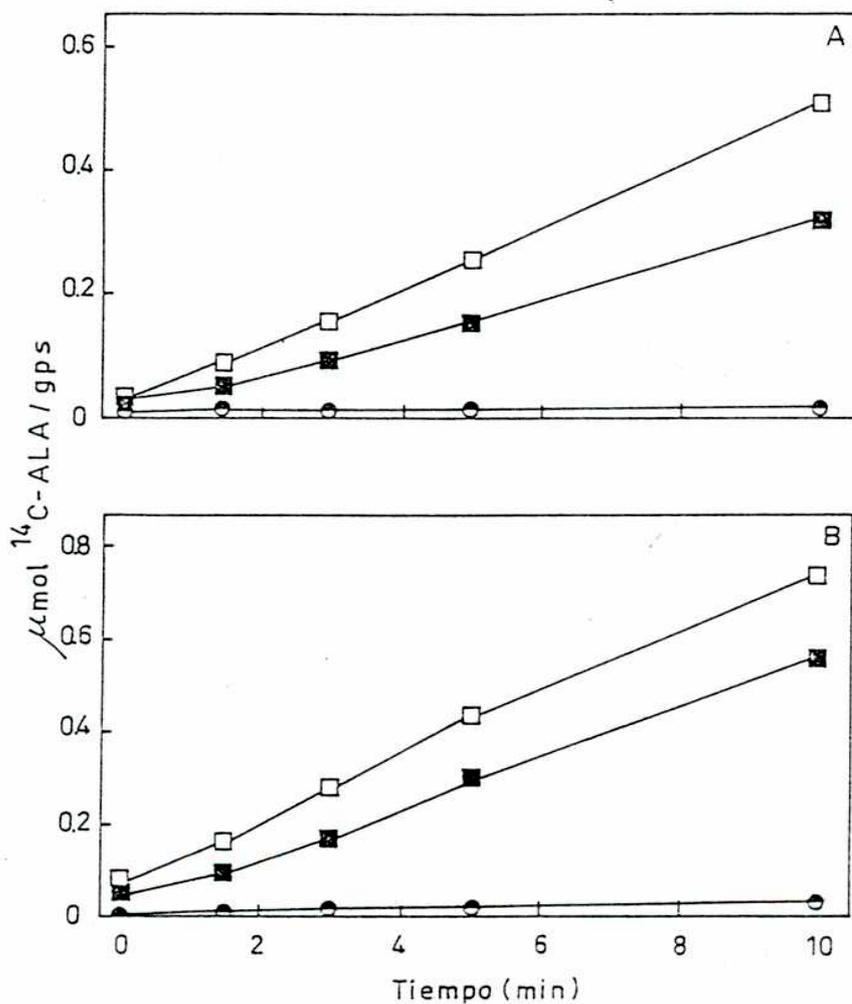


Figura I.1: Incorporación de ALA en células de las cepas D27 y D27/C6 crecidas en medios complejos. La incorporación de ALA se midió en células de las cepas D27 (\circ , \square) y D27/C6 (\bullet , \blacksquare) crecidas en medio YPD (\circ , \bullet) y en YPet (\square , \blacksquare). Las concentraciones de ALA externa fueron 0.05 mM (A) y 1.0 mM (B).

Si bien cada vez que se midió la incorporación de ALA en medios complejos, la diferencia entre ellos se mantuvo, los valores absolutos de ^{14}C -ALA/gps no fueron reproducibles.

Por este motivo, y para poder estudiar también el efecto de la fuente de nitrógeno sobre el transporte de ALA, se resolvió determinar la incorporación de ALA en células crecidas en medios mínimos.

I.2.2 Medios mínimos

En este caso se utilizó como fuente de carbono glucosa 0.3%, glicerol 3% o etanol 3%. No se usó glucosa 2% porque como ya se indicó, inhibe casi completamente el transporte de ALA (Figura I.1).

Por otra parte se emplearon dos fuentes de nitrógeno: una fuente rica, amonio (MAM), y una fuente pobre, prolina (MPM).

En la Figura I.2 se muestra la incorporación de ALA en células de la cepa D27 crecidas en seis medios diferentes con concentraciones de ALA externas de 0.05 mM y 1.0 mM. Se observa aquí un notable efecto de la fuente de nitrógeno; el transporte de ALA fue prácticamente nulo cuando las células crecieron en presencia de una fuente de nitrógeno rica (amonio). Es decir que el sistema de transporte de ALA se

encuentra regulado por nitrógeno al igual que la GAP y varias permeasas específicas de aminoácidos (Wiame y col., 1984).

Por lo tanto, de la Figura I.2 se desprende que la mejor condición de crecimiento celular para determinar entrada e incorporación de ALA en esta cepa es en un medio de cultivo con una fuente de carbono no fermentable (glicerol) y una fuente de nitrógeno pobre (prolina).

Bajo estas condiciones y luego de 10 minutos de incubación, el ALA se concentra intracelularmente 18 y 5 veces a baja y alta concentración externa de ALA respectivamente; además, la incorporación es prácticamente lineal durante los primeros 10 minutos de incubación.

Los perfiles de los valores de incorporación de ALA en la cepa D27/C6 crecida en los mismos seis medios (Figura I.3) son similares a los encontrados para la cepa D27, excepto que se detecta una incorporación importante en medio MPM-Gluc 0.3% y que la incorporación es lineal sólo hasta los primeros 5 minutos de incubación. En células de la cepa mutante crecidas en MPM-Gli, el sistema de transporte de ALA es concentrativo, 52 y 5 veces, frente a concentraciones externas de ALA de 0.05 mM y 1.0 mM, respectivamente.

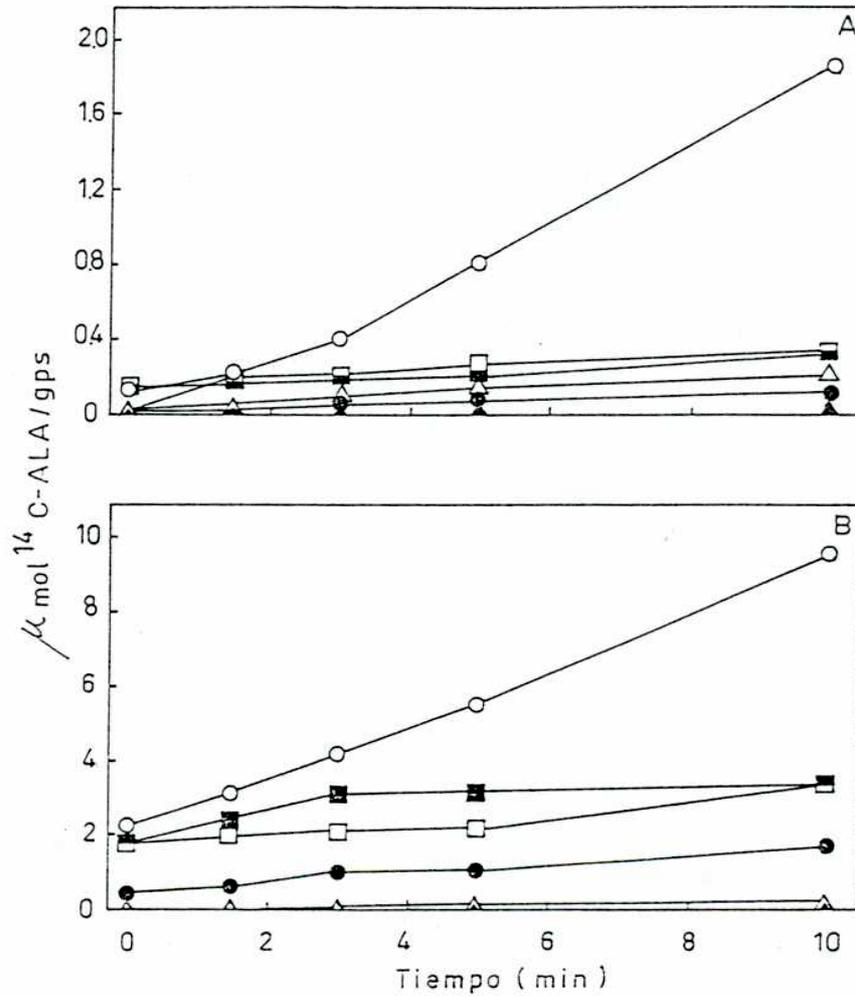


Figura I.2: Incorporación de ALA en células de la cepa D27 crecidas en medios mínimos. La incorporación de ALA se midió en células crecidas en medio MPM-Gli (○), MPM-Et (□), MPM-Gluc (△), MAM-Gli (●), MAM-Et (■) y MAM-Gluc (▲). Las concentraciones de ALA externo fueron 0.05 mM (A) y 1.0 mM (B).

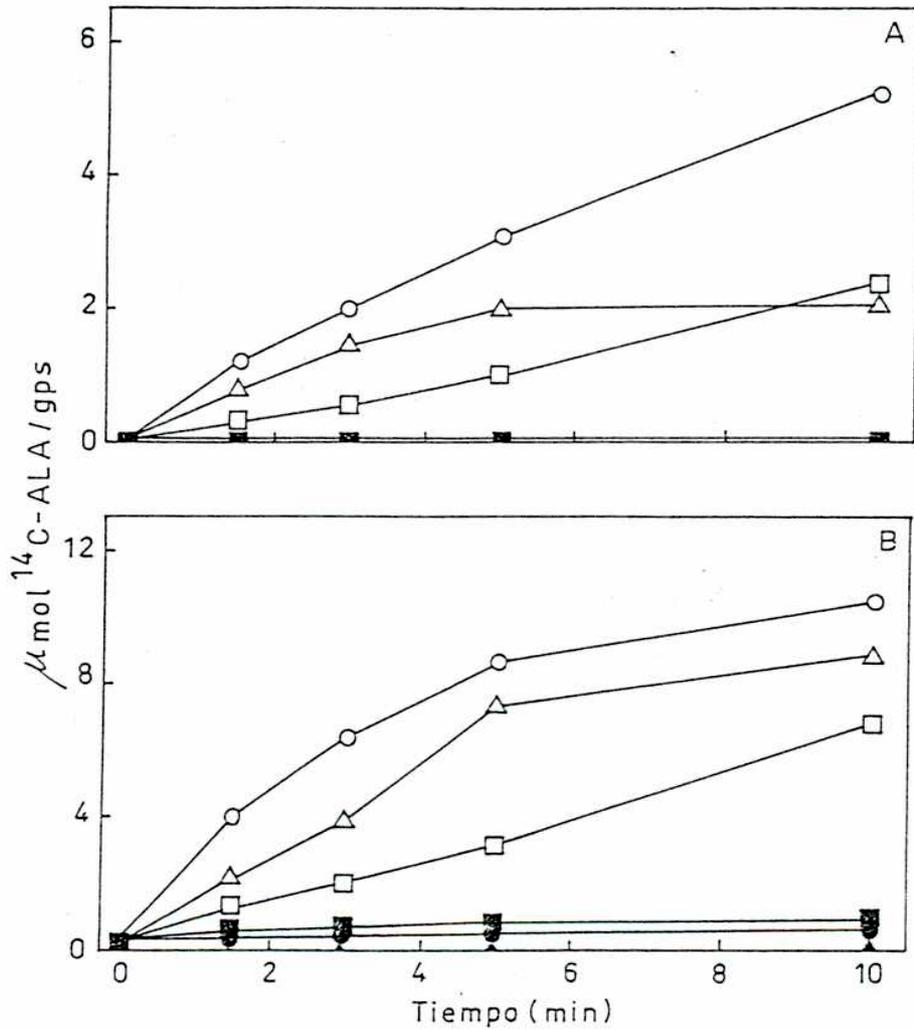


Figura I.3: Incorporación de ALA en células de la cepa D27/C6 crecidas en medios mínimos. La incorporación de ALA se midió en células crecidas en medio MPM-Gli (○), MPM-Et (□), MPM-Gluc (△), MAM-Gli (●), MAM-Et (■) y MAM-Gluc (▲). Las concentraciones de ALA externo fueron de 0.05 mM (A) y 1.0 mM (B).

Otra diferencia interesante entre ambas cepas es que en la D27 los valores de $\mu\text{mol } ^{14}\text{C-ALA/gps}$ medidos a tiempo cero son significativamente mayores que en la D27/C6.

La unión de sustrato a las células a tiempo cero, generalmente se adjudica a la presencia de proteínas en el espacio periplasmático, que se unirían muy rápidamente a la molécula a transportar.

Si esto fuera así, es de esperar que el transporte de ALA en protoplastos o en células a las que se les realizó shock osmótico se vea afectado.

Por este motivo, se intentó preparar protoplastos empleando la metodología descrita en Materiales y Métodos a partir de células de ambas cepas. Sin embargo, con ninguna de las enzimas ensayadas se logró una efectiva formación de protoplastos.

Además, el tratamiento de las células con una solución hipertónica seguido de una solución hipotónica, no produjo liberación de proteínas en los fluidos osmóticos.

En consecuencia, no se pudo comprobar la existencia de proteínas de "binding" en el espacio periplasmático.

Así, se determinaron las condiciones de crecimiento que permitirían un mejor estudio del sistema de transporte de ALA a través de membrana, en la cepa D27 y en su mutante, D27/C6.

I.3 Recuperación y análisis del ^{14}C acumulado

Para caracterizar el sistema de transporte de un determinado compuesto es importante asegurarse de que la incorporación del mismo esté disociada de su metabolización. Por lo tanto, se procedió a identificar en qué compuesto se encuentra el ^{14}C incorporado, luego de permitir la entrada de ^{14}C -ALA, en las células de las cepas D27 y D27/C6 durante 10, 15 y 30 minutos. Este análisis se realizó con células crecidas en MPM-Gli. De todos los medios de crecimiento utilizados, se seleccionó éste para llevar a cabo este análisis debido a que es un medio mínimo con una fuente de carbono no fermentable, en el cual se espera que la velocidad de metabolización de ALA sea alta, por el elevado requerimiento de citocromos.

Se observó que bajo estas condiciones, a lo sumo el 10% del ^{14}C incorporado a las células no es soluble en metanol, aún cuando se permita la entrada de ^{14}C -ALA durante 30 minutos. De este 10%, posiblemente no todo se deba a la metabolización del ALA, sino que la extracción aminoacídica puede haber sido incompleta.

Además, la cromatografía en papel de la fracción soluble en metanol mostró que la radiactividad estaba asociada a un único pico con un valor de R_f coincidente con el de ALA (Figura I.4).

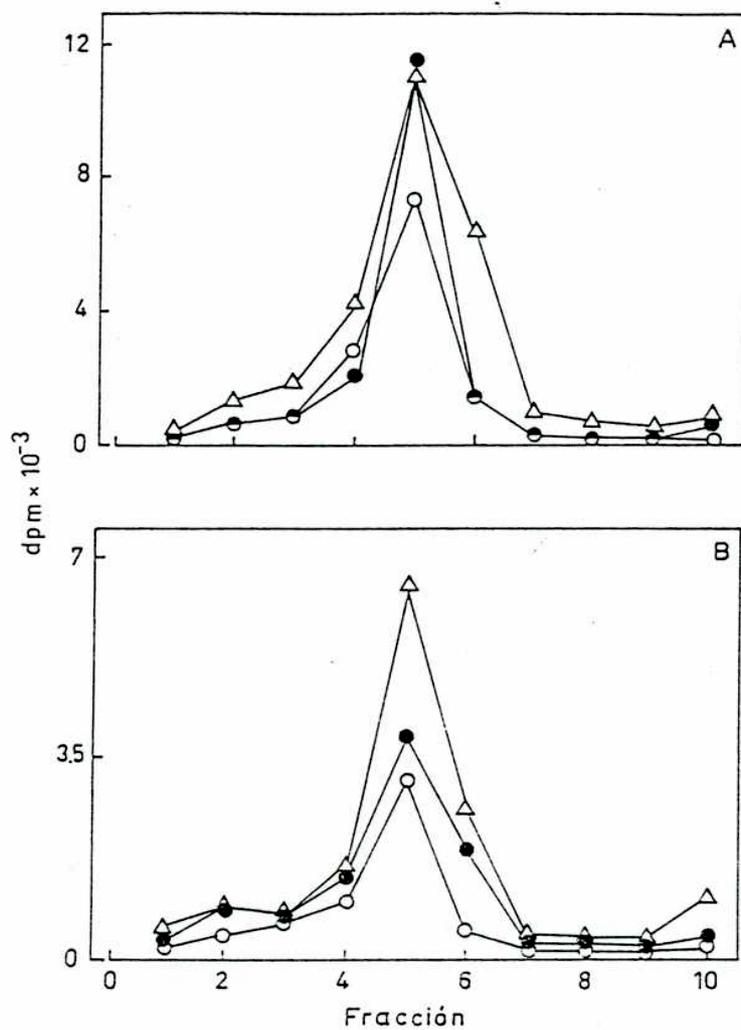


Figura I.4: Recuperación y análisis del ALA acumulado en células de las cepas D27 (A) y D27/C6 (B). Las células fueron preincubadas con 1.0 mM de ^{14}C -ALA durante 10 (○), 15 (●) y 30 (△) minutos.

De esta manera, se determinó que se pueden realizar incubaciones de hasta 30 minutos en los ensayos de incorporación, sin que la metabolización de ALA influya sobre su propio transporte a través de membrana.

I.4 Salida y desplazamiento de ALA acumulado

En todo estudio de sistemas de transporte, es necesario verificar si el sustrato puede o no ser removido de las células. Por eso se decidió determinar si el ALA acumulado intracelularmente sale o es desplazado por el ALA externo, durante los intervalos de tiempo empleados en los ensayos de incorporación.

Durante períodos de incubación de 15 minutos, no se detecta eflujo de ALA acumulado previamente en las células de las cepas D27 y D27/C6 (Figura I.5).

Además, el intercambio del ALA intracelular con el externo es muy limitado (Figura I.6).

En *S. cerevisiae* la mayoría de los aminoácidos son transportados irreversiblemente. Hasta hoy, sólo la permeasa específica de prolina PUT4 parece no seguir esta regla (Grenson, 92).

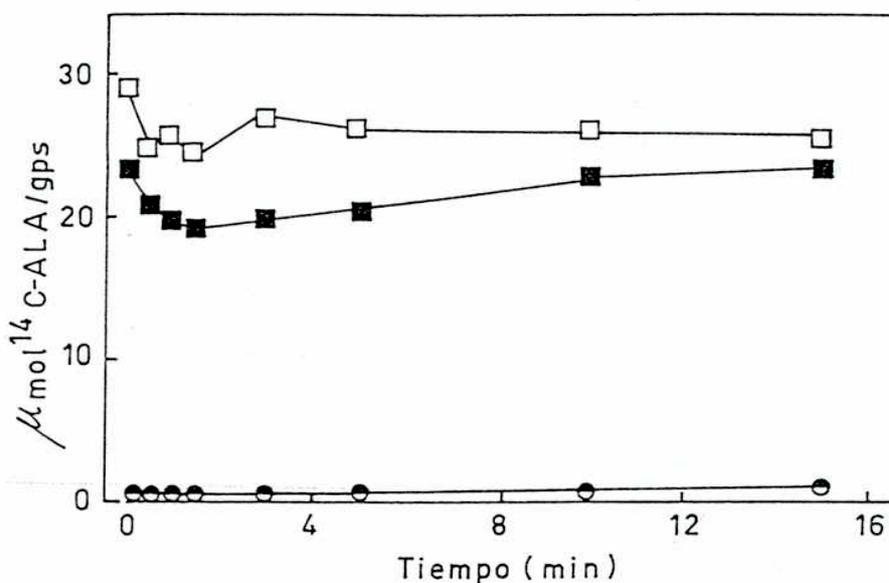


Figura I.5: Salida del ALA acumulado en células de las cepas D27 y D27/C6. Las células de las cepas D27 (○, □) y D27/C6 (●, ■) crecieron en medio MPM-Gli. La radiactividad se midió tanto en el pellet (□, ■) como en el sobrenadante (○, ●).

I.5 Lavado de las muestras

Como se indica en Materiales y Métodos, la medición de la incorporación de ALA se realiza incubando las células con el ¹⁴C-ALA a diferentes tiempos y tomando muestras que se filtran y se lavan. Para determinar cuántos lavados con 2 ml de buffer ftalato ácido de potasio 20 mM son necesarios

para separar toda la marca pegada a las células inespecíficamente, se recogieron los líquidos de 5 lavados consecutivos en los cuales se midió la radiactividad.

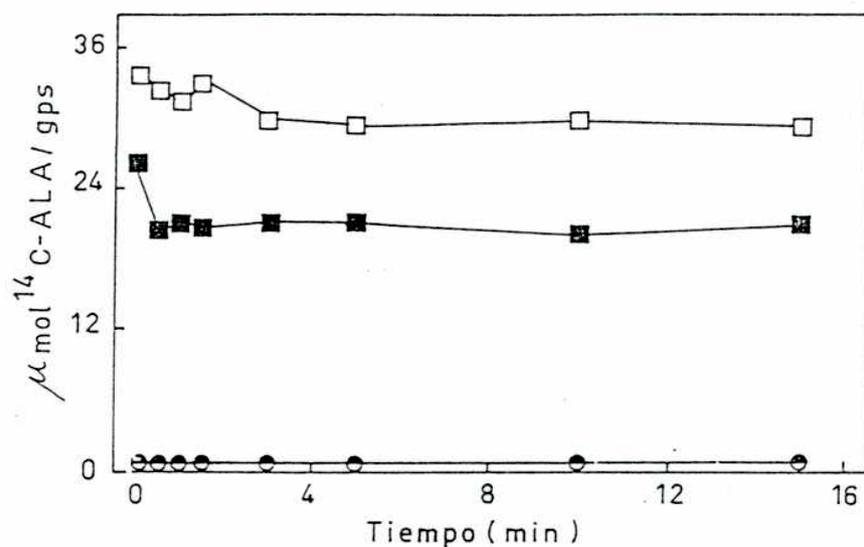


Figura I.6: Desplazamiento del ALA acumulado por ALA externo en células de las cepas D27 y D27/C6.

Las células de las cepas D27 (○, □) y D27/C6 (●, ■) crecieron en medio MPM-Gli. La radiactividad se midió tanto en el pellet (□, ■) como en el sobrenadante (○, ●).

En el líquido del tercer lavado ya no se detecta marca (Tabla I.II). Esto indica que con sólo dos lavados de 2 ml cada uno, se despega la marca pegada a las células no específicamente.

Tabla I.II: Lavado de las muestras

Nº lavado	cpm
1	14929.1
2	565.9
3	70.0
4	53.9
5	43.6

Se emplearon células de las cepas D27 crecidas en medio MPM-Gli.

En todos los experimentos aquí descritos se realizaron tres lavados de 2 ml cada uno.

I.6 Determinación del pH óptimo

En la Figura I.7 se muestra la incorporación de ALA en células de la cepa D27 crecidas en MPM-Gli. El sistema de transporte de ALA es dependiente de la concentración externa de protones y su actividad es máxima alrededor del pH 5.0. Por este motivo todos los ensayos aquí presentados se realizaron a este pH.

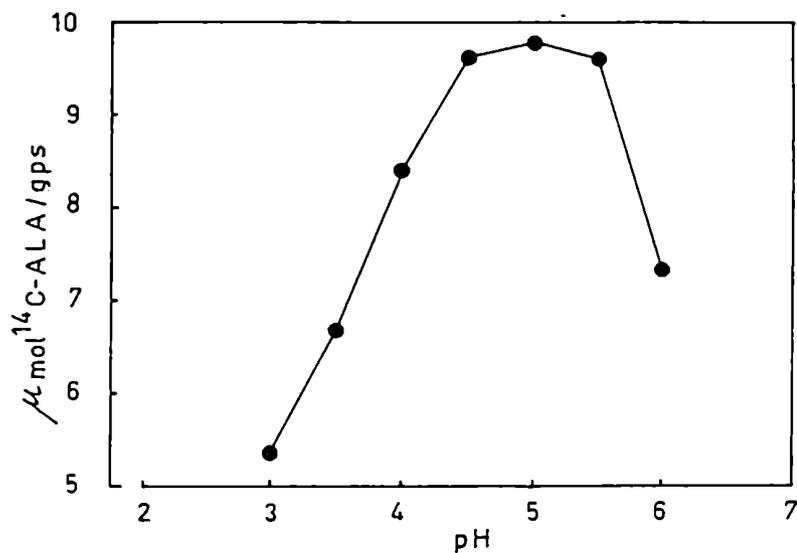


Figura I.7: Efecto del pH externo sobre la concentración de ALA.

Se emplearon células de la cepa D27 crecidas en medio MPM-Gli. La concentración de ALA externo fue 1.0 mM.

I.7. Inhibidores del metabolismo energético

Para determinar la dependencia energética de la incorporación de ALA, se midió su entrada en presencia de varios compuestos que inhiben distintos pasos del metabolismo energético. En la Tabla I.III se muestran los resultados obtenidos.

Tabla I.III: Efecto de inhibidores del metabolismo energético

Inhibidor	concentración (μM)	% de inhibición	
		D27	D27/C6
CCCP	100	70	70
DNP	50	48	44
NaN_3	50	40	30
KCN	50	35	20
DES	100	15	10
DCCD	100	20	7

Las células crecieron en medio MPM-Gli. La concentración de ALA externo fue 1.0 mM. El valor control fue 5.5 $\mu\text{mol } ^{14}\text{C-ALA/gps}$.

El CCCP (carbamilcianuro-3-clorofenilhidrazona) y el DNP (dinitrofenol), ambos potentes desacoplantes de la fosforilación oxidativa, son los compuestos que más inhiben la incorporación de ALA en estas cepas. El KCN (cianuro de potasio) y la NaN_3 (ácida sódica), compuestos que inhiben la transferencia de electrones de la cadena respiratoria a nivel de la citocromo oxidasa, inhiben el transporte de ALA entre un 20-40%. Estos resultados sugieren que el sistema de transporte de ALA es dependiente de energía.

El hecho de que ni el DCCD (NN'-diciclohexilcarbodiimida) ni el DES (dietilstilbestrol), ambos inhibidores de la bomba H^+ -ATPasa, tengan efecto

alguno sobre la incorporación de ALA puede deberse a la existencia de una reserva energética celular.

I.8. Especificidad del sistema transportador de ALA

La inhibición competitiva y los comportamientos cinéticos y de regulación se encuentran entre los criterios más comunes para distinguir un tipo de sistema de transporte de otro.

Por este motivo, se decidió estudiar el transporte de ALA en presencia de distintos compuestos relacionados estructuralmente o no.

Dada la amplia especificidad de la permeasa general de aminoácidos (GAP) y el hecho de que el ALA es un δ -aminoácido, se decidió determinar si este compuesto utiliza la GAP para entrar a las células.

En *S. cerevisiae* la citrulina es transportada a través de membrana exclusivamente por la GAP (Grenson y col., 1970). Por lo tanto, se midió la incorporación de ALA en presencia de ese aminoácido. Se observó que el transporte de ALA no se lleva cabo a través de la GAP ya que la citrulina no inhibe significativamente la entrada de ALA (Tabla I.IV).

También se estudió el efecto de otros compuestos. Como se observa en la Tabla I.IV el GABA es el inhibidor más

potente, alcanzando en algunos casos una inhibición del 97%, e inhibiendo aún más que el propio ALA. Otros compuestos que inhiben significativamente el transporte de ALA son el ácido ϵ -aminocaproico (47-69%), β -alanina (50%), ornitina (43-58%), glicil-glicina (45%) y lisina (30-40%).

De la comparación de las estructuras de los compuestos ensayados (Figura I.8) surge que aquellos que poseen un grupo metil-amino terminal ($-\text{CH}_2\text{-NH}_2$) inhiben el transporte de ALA, mientras que los que no lo tienen no tienen efecto alguno sobre este transporte. Es decir, que el grupo metil-amino sería esencial para el transporte de ALA. Pero además, se debe hacer notar que la carga negativa del grupo carboxilo terminal también parece ser importante en la interacción ALA-proteína translocadora.

Como ya se mencionó, el GABA, es transportado a través de membrana en células de *S. cerevisiae* mediante tres permeasas: el de la permeasa general de aminoácidos (GAP), el específico de prolina (PUT4) y el específico de GABA (UGA4). La fuerte inhibición del transporte de ALA por GABA está indicando que ambos compuestos podrían compartir una misma permeasa. El hecho de que la prolina no inhiba la incorporación de ALA descarta la posibilidad de que la permeasa compartida por ambos compuestos sea la PUT4.

Tabla I.IV: Efecto de varios compuestos sobre el transporte de ALA

	% de inhibición			
	D27		D27/C6	
	0.05 mM	1.0 mM	0.05 mM	1.0 mM
ALA	70	84	73	72
GABA	97	95	95	81
ác. ϵ -aminocaproico	67	69	47	59
β -alanina	-	50	-	-
ornitina	-	43	-	-
lisina	40	33	30	35
espermidina	24	38	6	25
putrescina	14	30	10	28
glicina	10	17	10	23
ác. levulínico	0	13	7	18
ác. α -aminobutírico	9	14	26	18
ác. glutámico	7	18	1	20
prolina	0	17	13	9
metionina	10	28	0	10
leucina	20	20	15	8
norleucina	19	15	0	13
ác. málico	-	5	-	-
citrulina	-	12	17	7
ác. p-aminohipúrico	4	17	9	21
glicil-glicina	-	45	-	-

Las células crecieron en medio MPM-Gli. Los valores controles fueron de 1.2 y 5.1 $\mu\text{mol } ^{14}\text{C-ALA/gps}$ para las cepas D27 y D27/C6 para la concentración de ALA externo 0.05 mM y de 6.1 y 8.3 $\mu\text{mol } ^{14}\text{C-ALA/gps}$ para la concentración de ALA externo 1.0 mM.

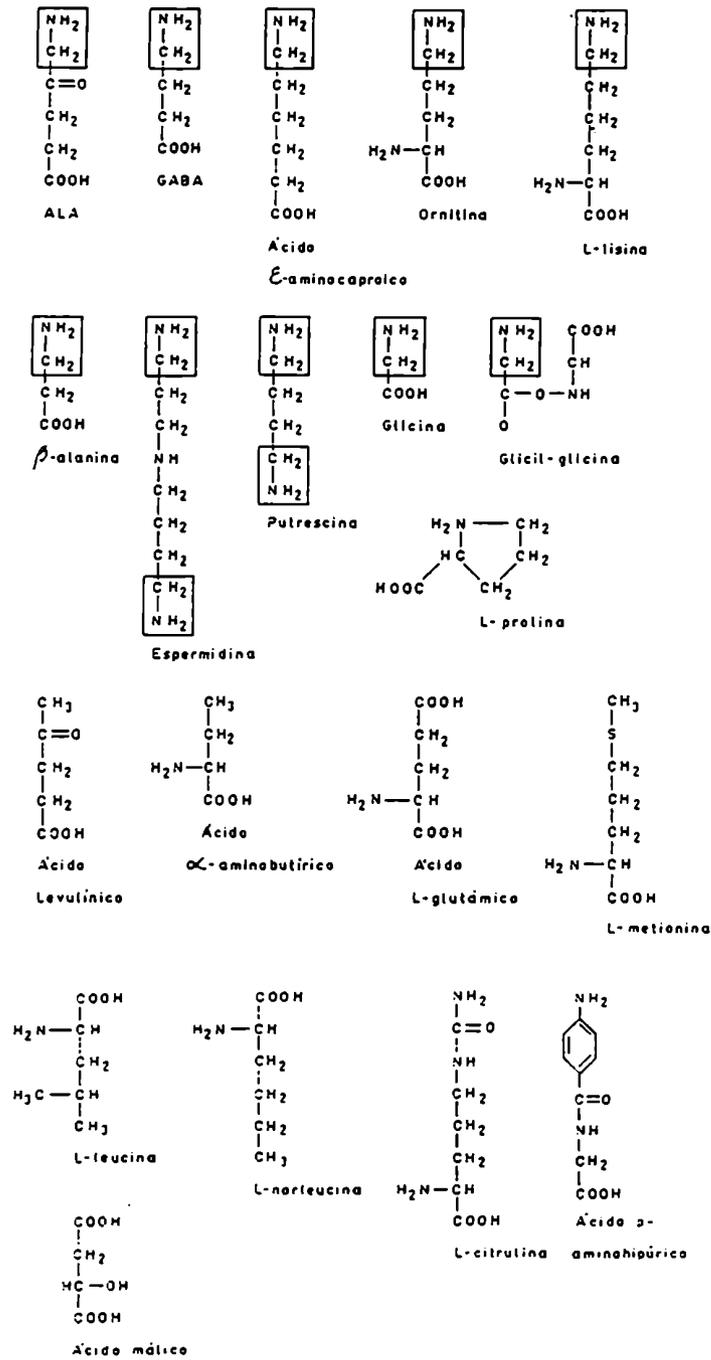


Figura I.8: Estructura de los compuestos empleados en los estudios de especificidad.

I.9. Parámetros cinéticos

Teniendo en cuenta que bajo estas condiciones experimentales sólo se mide el influjo de ALA y que éste no es metabolizado, se pudieron determinar los parámetros cinéticos del sistema de transporte de ALA.

Los parámetros cinéticos se determinaron en células crecidas en condiciones en las cuales la entrada de ALA es concentrativa. En todos los casos, los valores de entrada de ALA en función de su concentración externa produjeron curvas hiperbólicas y los gráficos de dobles recíprocas fueron lineales. Estos resultados indican la presencia de un único sistema de transporte de ALA en las cepas D27 y D27/C6 (Figuras I.9, I.10, I.11, I.12 y I.13).

Los parámetros cinéticos calculados a partir de estos resultados se presentan en la Tabla I.V.

Hasta este momento los experimentos de incorporación de ALA se habían realizado incubando las células con dos concentraciones de ^{14}C -ALA (0.05 y 1.0 mM) debido a que no se conocían los parámetros cinéticos de este sistema de transporte. En vista de los valores de K_r obtenidos, se decidió continuar utilizando sólo la mayor de estas dos concentraciones (1.0 mM).

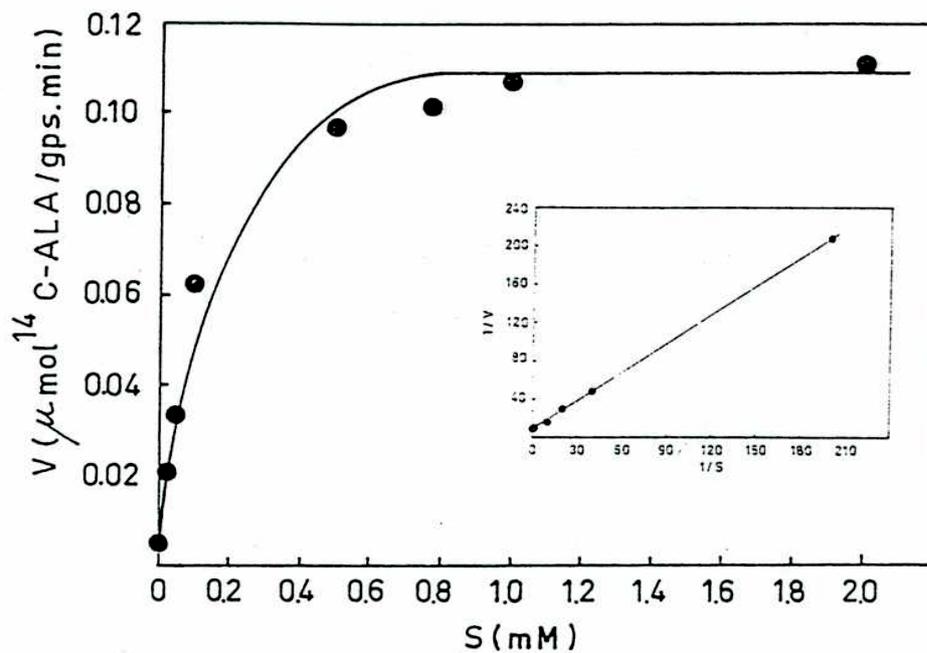


Figura I.9: Cinética de entrada de ALA en células de la cepa D27 crecidas en medio MPM-Et.
Inset: Representación de Lineweaver-Burk.

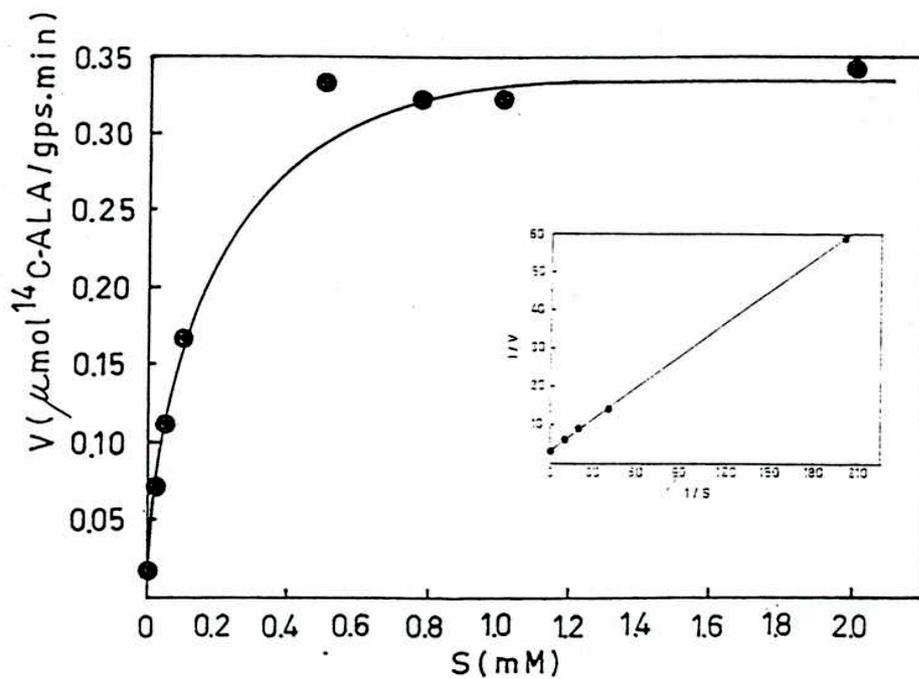


Figura I.10: Cinética de entrada de ALA en células de la cepa D27 crecidas en medio MPM-Gli.
Inset: Representación de Lineweaver-Burk.

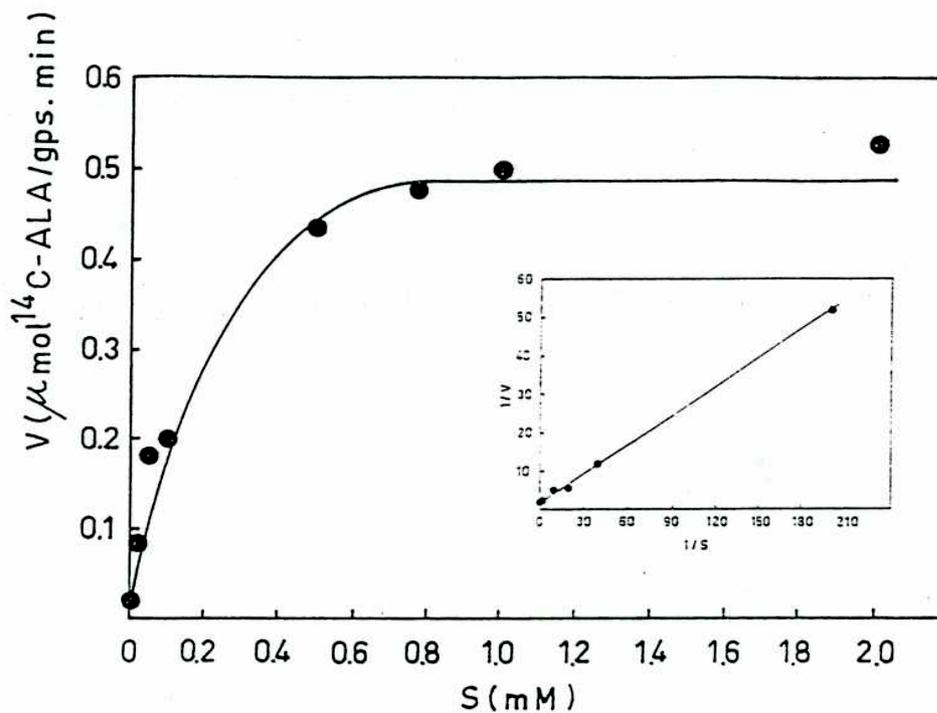


Figura I.11: Cinética de entrada de ALA en células de la cepa D27/C6 crecidas en medio MPM-Et.
Inset: Representación de Lineweaver-Burk.

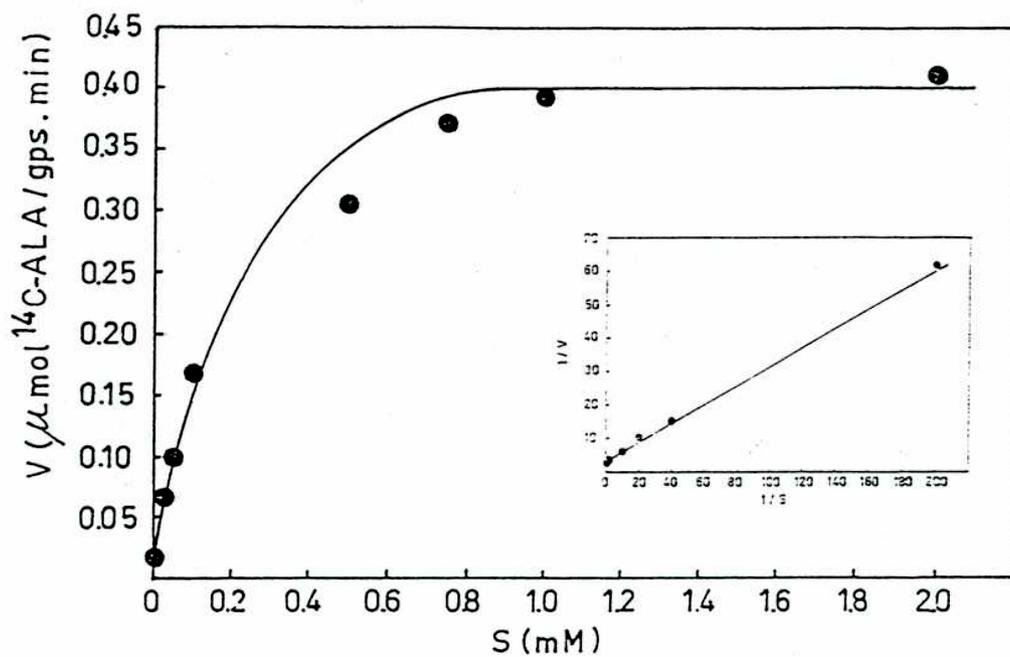


Figura I.12: Cinética de entrada de ALA en células de la cepa D27/C6 crecidas en medio MPM-Gli.
Inset: Representación de Lineweaver-Burk.

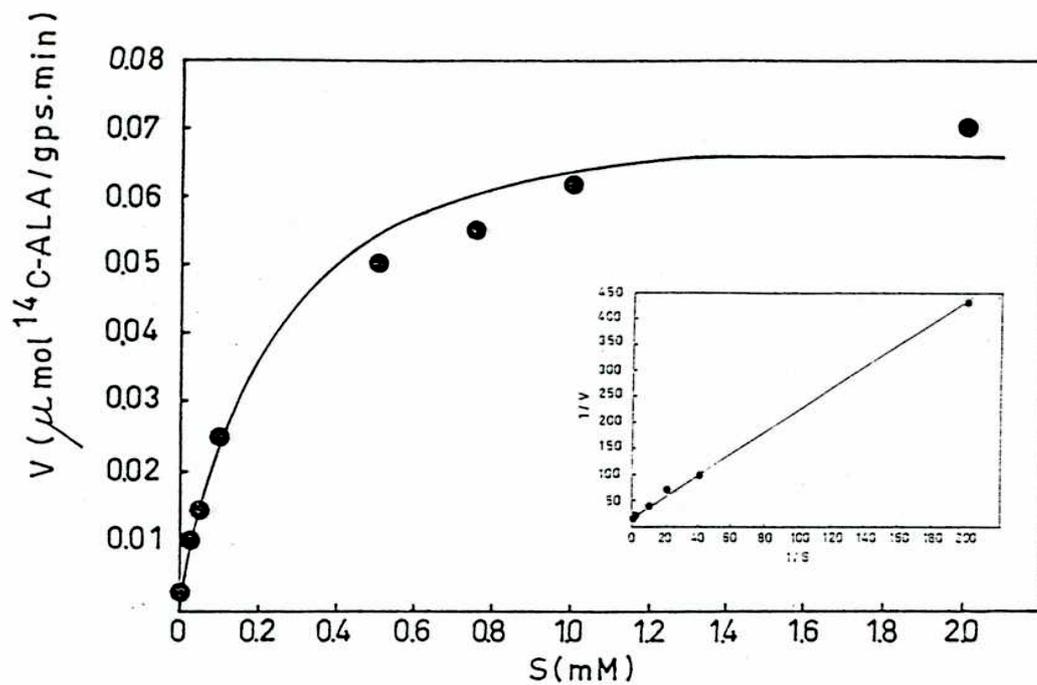


Figura I.13: Cinética de entrada de ALA en células de la cepa D27/C6 crecidas en medio MPM-Gluc.
Inset: Representación de Lineweaver-Burk.

Tabla I.V: Parámetros cinéticos

	MPM-Et		MPM-Gli		MPM-Gluc	
	K _T	V _{máx}	K _T	V _{máx}	K _T	V _{máx}
D27	0.12	0.12	0.10	0.36	-	-
D27/C6	0.14	0.56	0.10	0.36	0.13	0.36

Los valores aquí tabulados se calcularon a partir de las curvas de Lineweaver-Burk. K_T y V_{máx} se expresan en mM y $\mu\text{mol } ^{14}\text{C-ALA}/\text{gps.min}$, respectivamente.

I.10. Caracterización y función de grupos sulfhidrilos en la proteína translocadora

Los grupos tioles juegan un papel importante en la actividad de muchas proteínas incluyendo algunas proteínas de transporte (van Iwaarden y col., 1992). Por este motivo, se decidió caracterizar estos grupos en la proteína transportadora de ALA.

Para ello se midió la entrada de ALA luego de preincubar las células durante 5 minutos con varios reactivos de grupos tioles. Se puede afirmar que la actividad del sistema de transporte de ALA no se ve afectada por la presencia de ninguno de estos compuestos (Tabla I.VI).

Tabla I.VI: Efecto de reactivos de grupos tioles

Reactivo	concentración (mM)	% de inhibición	
		D27	D27/C6
NEMI	1.0	4	11
PCMB	1.0	10	10
DTNB	1.0	25	0
iodoacetamida	1.0	0	0
	10.0	15	12
Hg (II)	0.5	3	15
Pb (II)	0.5	28	14
KCN	10.0	30	30
cisteína	1.0	28	3
cisteína+NEMI	1+1	27	0
cisteína+PCMB	1+1	0	19

Las células crecieron en medio MPM-Gli. La concentración de ALA externo fue 1.0 mM.

NEMI: N-etilmaleimida

PCMB: p-cloromercuribenzoato

DTNB: 5,5'-ditiobis(2-nitrobenzoato)

De esta manera, se ha demostrado que la proteína de membrana responsable del transporte de ALA no posee grupos -SH esenciales para su actividad.

I.11. Determinación de la actividad de las enzimas que sintetizan y consumen el ALA

Luego de establecer que la incorporación del precursor en la síntesis de porfirinas, ALA, está fuertemente regulada tanto por la fuente de nitrógeno como

por la de carbono, se decidió investigar si su metabolización sufre el mismo tipo de regulación.

Para ello, se determinaron las actividades específicas de las dos primeras enzimas del camino biosintético de las porfirinas, el ALA-Sintetasa (ALA-S) y el ALA-Dehidrasa (ALA-D). Recordemos que el ALA-S es la enzima que cataliza la síntesis de ALA a partir de glicina y succinil CoA. El ALA-D condensa asimétricamente dos moléculas de ALA para formar el pirrol porfobilinógeno (PBG), el cual origina luego los distintos tetrapirroles, por polimerización.

Ya se han descrito variaciones en la actividad de estas dos enzimas en células de las cepas D27 y D27/C6 crecidas en medios complejos con distintas fuentes de carbono (Correa García y col., 1993). Se decidió determinar si estas diferencias se mantienen en las células crecidas en los medios mínimos que se utilizaron para caracterizar el sistema de transporte de ALA.

I.11.1. ALA-Sintetasa

En la Tabla I.VII se muestran los valores de actividad específica del ALA-S en células de las cepas D27 y D27/C6 crecidas en MPM-Et, MPM-Gli, MPM-Gluc, MAM-Et y MAM-

Gli y cosechadas en la fase de crecimiento exponencial tardía.

Tabla I.VII: Actividad de ALA-S

		Actividad de ALA-S	
		MPM	MAM
D27	Et	7.2	0.3
	Gli	0.4	2.5
	Gluc	2.7	0.7
D27/C6	Et	9.1	2.3
	Gli	1.2	5.8
	Gluc	1.7	2.9

La actividad específica se expresa en nmol ALA/mg prot.

Para ambas cepas la mayor actividad específica se encuentra cuando las células crecieron en presencia de una fuente pobre de nitrógeno (prolina) y etanol como fuente de carbono. Por otra parte, en ambas cepas crecidas en amonio como única fuente de nitrógeno la actividad más elevada se encuentra cuando la fuente de carbono es glicerol.

I.11.2. ALA-Dehidrasa

Se determinaron las actividades del ALA-D en células de las cepas D27 y D27/C6 crecidas en MPM-Et, MPM-Gli, MPM-Gluc, MAM-Et, MAM-Gli y MAM-Gluc y cosechadas en la fase exponencial tardía (Tabla I.VIII).

Tabla I.VIII: Actividad de ALA-D

		Actividad de ALA-D	
		MPM	MAM
D27	Et	1.8	2.9
	Gli	0.1	1.0
	Gluc	1.3	0.1
D27/C6	Et	1.4	0.4
	Gli	1.0	0.5
	Gluc	1.3	0.2

La actividad específica se expresa en nmol PBG/mg prot.

A partir de los resultados obtenidos no se puede establecer ninguna relación entre las actividades de las enzimas ALA-S y ALA-D en las dos cepas, medidas en las distintas condiciones de crecimiento indicadas. Sin embargo, resulta evidente de estos resultados que las fuentes de

nitrógeno y de carbono, regulan más al transporte de ALA que a las actividades de estas dos enzimas.

I.11.3. ALA intracelular

El ALA intracelular (ALA-I) es un indicador de la relación entre las actividades del ALA-S y ALA-D *in vivo*. Por lo tanto, se decidió determinar el ALA-I en ambas cepas crecidas en las condiciones antes mencionadas.

Los contenidos de ALA-I no varían con las condiciones de crecimiento (Tabla I.IX). Esto sugiere que, *in vivo*, la relación entre las actividades de ambas enzimas se mantiene constante. Es decir, que las diferencias observadas en el transporte de ALA en los distintos medios de crecimiento, no se deben a variaciones en su contenido intracelular.

Tabla I.IX: ALA-intracelular

		ALA-I	
		MPM	MAM
D27	Et	0.24	0.12
	Gli	0.29	0.16
	Gluc	0.21	0.22
D27/C6	Et	0.26	0.15
	Gli	0.28	0.18
	Gluc	0.26	0.18

Los valores se expresan en nmol ALA/mgps.

Por otro lado, se señala que el hecho de que se acumule ALA-I confirma que la enzima ALA-D es limitante en el camino biosintético de las porfirinas (Mattoon y col., 1978).

Como en todos los ensayos hasta aquí descritos, el comportamiento de la cepa D27 y de su mutante D27/C6, que sintetiza una alta cantidad de citocromos cuando crece en un medio con una fuente de carbono no fermentable, fueron similares, se decidió continuar este trabajo sólo con la cepa D27.

I.12. Incorporación de ALA en células crecidas en presencia de ALA

Para determinar si la presencia de ALA durante el crecimiento celular modifica la actividad de su sistema de transporte, se hicieron crecer células de la cepa D27 en MPM-Gli al que se le agregó ALA 1 mM y 5 mM al inicio del crecimiento o ALA 5 mM solamente 2 horas antes de cosechar.

Sólo se pudo estudiar el efecto del ALA agregado al medio como suplemento porque las células de la cepa D27 no son capaces de utilizar este compuesto como fuente de nitrógeno.

Se midió la incorporación de ALA en dichas células y también el ALA-I.

En las células crecidas en presencia de ALA, el ALA-I es significativamente mayor que en las células control (Tabla I.X).

La presencia de ALA en el medio de crecimiento produce un efecto inhibitorio sobre la incorporación de ALA ya que se encuentran diferencias significativas entre el transporte en células crecidas con o sin ALA en el medio (Figura I.14).

Tabla I.X: ALA-intracelular

	ALA-I
MPM-Gli	0.06
MPM-Gli + ALA 1 mM	2.67
MPM-Gli + ALA 5 mM	7.00
MPM-Gli + ALA 5 mM*	1.55

Se emplearon células de la cepa D27. Los valores se expresan en nmol ALA/mgps. * ALA agregado 2 horas antes de cosechar.

Por otra parte, el grado de inhibición del sistema de transporte de ALA es similar en presencia de distintos niveles de ALA-I (2.64 y 7.00 nmoles ALA/mgps). Sin embargo, debe notarse que el efecto de niveles similares de ALA-I (1.55 y 2.64 nmoles ALA/mgps) es diferente dependiendo de cuánto tiempo estos niveles estuvieron presentes.

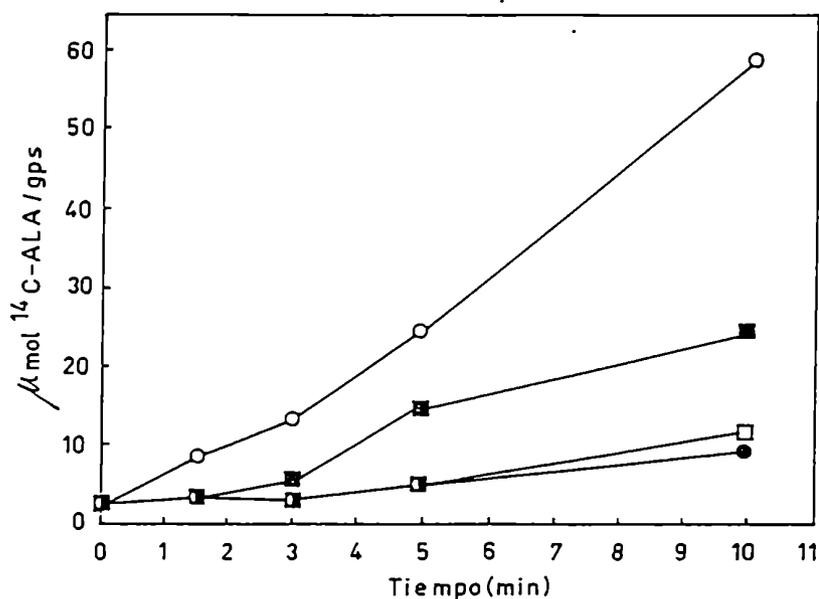


Figura I.14: Incorporación de ALA en células de la cepa D27 crecidas en presencia de ALA. Las células crecieron en medio MPM-Gli (O), MPM-Gli suplementado con ALA 1 mM (●), 5 mM (□) o suplementado con ALA 5 mM sólo durante las últimas 2 horas de crecimiento (■).

I.13. Transporte de PBG

Se decidió investigar si el otro precursor en la biosíntesis de las porfirinas, PBG, es incorporado a las células de levadura. Para ello se empleó un método de medición de la incorporación de ^{14}C -PBG similar al descrito en Materiales y Métodos para el transporte de ALA.

Como se observa en la Figura I.15, el PBG no se transporta a través de membrana.

Estos resultados eran esperados ya que la incapacidad de la captación de PBG había sido observada con anterioridad y más recientemente (Ebbon y Tait, 1969; Batlle y col., 1975; Helson y col., 1993).

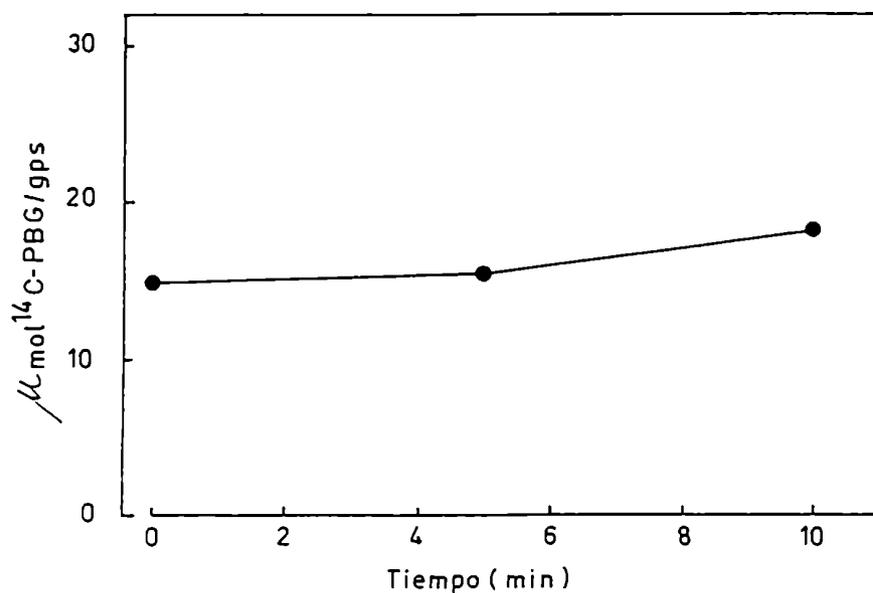


Figura I.15: Incorporación de PBG en células de la cepa D27 crecidas en medio MPM-Gli. La concentración de PBG externo fue 1.3 mM.

I.14. Conclusiones

En este capítulo se describe el primer estudio de caracterización del sistema de transporte de ALA en *S. cerevisiae*. Se determinó que:

- el ALA sufre transporte concentrativo
- el sistema de transporte de ALA está regulado tanto por la fuente de nitrógeno como por la de carbono
- las fuentes de carbono y de nitrógeno no afectan significativamente ni de forma similar, a las enzimas que metabolizan ALA, ALA-S y ALA-D, como lo hacen con su permeasa
- el medio de cultivo que permite la mejor medición de la incorporación de ALA es el que contiene una fuente de carbono no fermentable (glicerol) y una fuente de nitrógeno pobre (prolina)
- el ALA incorporado no es metabolizado durante los primeros 30 minutos de incubación
- el ALA incorporado no sale ni se intercambia con el ALA extracelular
- el pH óptimo de este sistema de transporte se encuentra en el rango 4.5-5.5
- el transporte de ALA es dependiente de energía
- compuestos como el GABA, el ácido ϵ -aminocaproico, la ornitina y la β -alanina que poseen en su estructura el

resto $-CH_2NH_2$ inhiben significativamente la incorporación de ALA

- por estudios cinéticos, se determinó que el ALA es transportado por un único sistema

- los valores de K_T de este sistema de transporte no varían con los distintos medios de crecimiento empleados y están en el orden de 0.1 mM

el ALA intracelular regula la actividad del sistema de transporte de ALA

- el PBG no se transporta a través de membrana

TRANSPORTE DE GABA

	Página
II.1. Identificación de los sistemas transportadores	88
II.2. Recuperación y análisis del ^3H acumulado intracelularmente	92
II.3. Efecto de las fuentes de carbono y de nitrógeno	92
II.4. Regulación de la incorporación de GABA por GABA	93
II.5. Especificidad del sistema de transporte de GABA	96
II.6. Estudios cinéticos	99
II.7. Conclusiones	100

II. TRANSPORTE DE GABA

II.1. Identificación de los sistemas transportadores

Los ensayos de inhibición presentados en I.8 sugirieron que el ALA y el GABA podrían utilizar una misma permeasa para ingresar a la célula.

En *Saccharomyces cerevisiae*, el GABA es transportado a través de membrana mediante tres permeasas: GAP, PUT4 y UGA4 (Grenson y col., 1987). Por lo tanto, se decidió establecer, en primer lugar, si estos tres sistemas eran funcionales en la cepa D27.

La citrulina sólo es incorporada a las células mediante la GAP. El transporte de citrulina en células de la cepa D27 crecidas en medio MPM-Gluc 2% fue prácticamente indetectable (Figura II.1) con una velocidad inicial de incorporación de 0.01 μ moles ^{14}C -citrulina/gps.min, sugiriendo que esta cepa podría ser una mutante *gap*.

Además, se comparó el crecimiento en placas con diferentes medios de cultivo de esta cepa con otras con actividad de GAP conocida (Tabla II.I). La D27 muestra un crecimiento similar al de las cepas 2512C y MMY2/H3, ambas *gap1*, de lo cual se deduce y confirma que sería deficiente en la actividad de la permeasa general de aminoácidos.

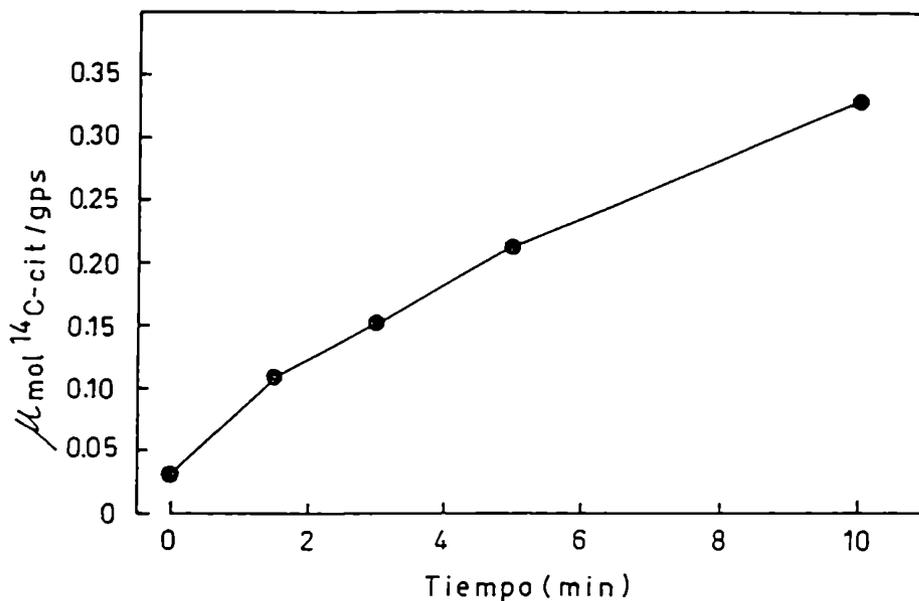


Figura II.1: Incorporación de citrulina en células de la cepa D27. Las células crecieron en medio MPM-Gluc 2%. La concentración externa de citrulina fue 0.05 mM.

Los mismos ensayos se realizaron en la cepa D27/C6 que deriva de la cepa D27 (Figura II.2; Tabla II.I). Como era de esperar, esta cepa resultó ser deficiente en la actividad de GAP, mostrando una velocidad inicial de incorporación de 0.015 $\mu\text{mol } ^{14}\text{C-citrulina/gps.min}$.

Tabla II.I: Crecimiento celular en placas

	D27	D27/C6	MMY2	MMY2/H3	2512c
MPM-Gli	++	++	++	+	++
MM-Gli	-	-	-	-	-
MCitM-Gli	-	-	+	-	-
MPM-Gli+D-his	++	++	-	+	++

La concentración de citrulina agregada al medio de cultivo fue 1.0 mM y la de D-histidina fue 10 mM. El medio MM-Gli, que no contiene fuente de nitrógeno, se utilizó como control negativo.

La prolina es incorporada a las células de levadura mediante dos sistemas: uno específico codificado por el gen PUT4 y la permeasa general de aminoácidos (GAP1). Como la GAP no es funcional en las cepas D27 y D27/C6, la prolina sólo podrá ser transportada en estas cepas por el sistema específico PUT4. La capacidad de estas cepas de utilizar prolina como fuente de nitrógeno demuestra que la permeasa PUT4 es funcional en ambos casos.

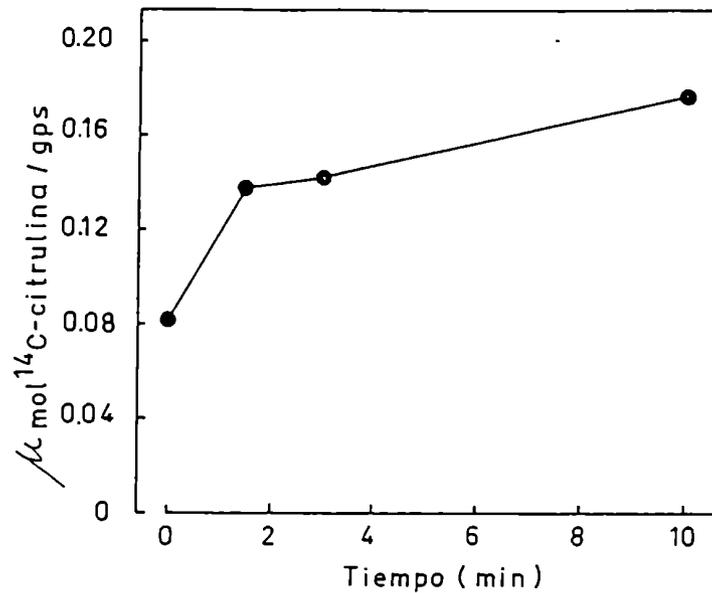


Figura II.2: Incorporación de citrulina en células de la cepa D27/C6. Las células crecieron en medio MPM-Gluc 2%. La concentración externa de citrulina fue 0.05 mM.

Por lo tanto, en el caso de que el ALA y el GABA compartan una permeasa, la permeasa compartida sería la codificada por el gen UGA4.

Para confirmar esta hipótesis, se decidió estudiar la relación entre el transporte de ALA y GABA. Para ello, se realizó en primer lugar, una caracterización general del sistema de transporte de GABA en la cepa D27.

II.2. Recuperación y análisis del ^3H acumulado intracelularmente

Se estudió en qué compuesto se encuentra el ^3H incorporado, luego de permitir la entrada de ^3H -GABA 1 mM en células de la cepa D27 durante 5, 10 y 30 minutos. Este análisis se realizó con células crecidas en los medios MPM-Gli y en MGABAM-Gli. Se determinó que en estas condiciones de ensayo sólo el 10% del ^3H incorporado se encuentra en la fracción insoluble en metanol. Además, todo el material radiactivo presente en la fracción soluble corrió como un único pico con un R_f idéntico al de GABA (Figura II.3).

II.3. Efecto de las fuentes de carbono y de nitrógeno

El efecto de las fuentes de carbono y de nitrógeno se muestra en la Figura II.4. La incorporación de GABA se ve reprimida por la presencia de una fuente de carbono fermentable como glucosa 0.3%. Este efecto es similar al que ya se había observado para el transporte de ALA.

Por otra parte, la incorporación de GABA fue similar en células crecidas con prolina o con amonio como fuente de nitrógeno. Este resultado es llamativo ya que ha sido demostrado que los tres sistemas de transporte de GABA en *S. cerevisiae*, así como otras permeasas de aminoácidos, son

sensibles a la presencia de iones amonio (Grenson y col., 1987). La diferencia entre nuestros resultados y los publicados por otros autores puede deberse tanto a las cepas como al empleo de métodos distintos para medir la incorporación del aminoácido. Dr. M. Grenson mide la incorporación celular de un determinado compuesto mientras las células permanecen en el medio de cultivo; en cambio, nuestro sistema de medición consiste en incubar las células previamente cosechadas y lavadas, en buffer con el sustrato.

II.4 Regulación de la incorporación de GABA por GABA

Se determinó la incorporación de GABA en células de la cepa D27 crecidas en medio MPM-Gli suplementado con GABA 5 mM o 10 mM. Como se muestra en la Figura II.5, este sistema de transporte se encuentra fuertemente inhibido cuando las células han crecido en presencia de GABA.

La incorporación de GABA en células crecidas en medio con GABA como única fuente de nitrógeno (MGABAM-Gli), también se encuentra fuertemente disminuída, con una velocidad inicial de incorporación tres veces menor que en células crecidas en medio con prolina (MPM-Gli) (Figura II.6), donde ha sido propuesto que la actividad de la permeasa PUT4 es prácticamente indetectable (Grenson y col., 1987).

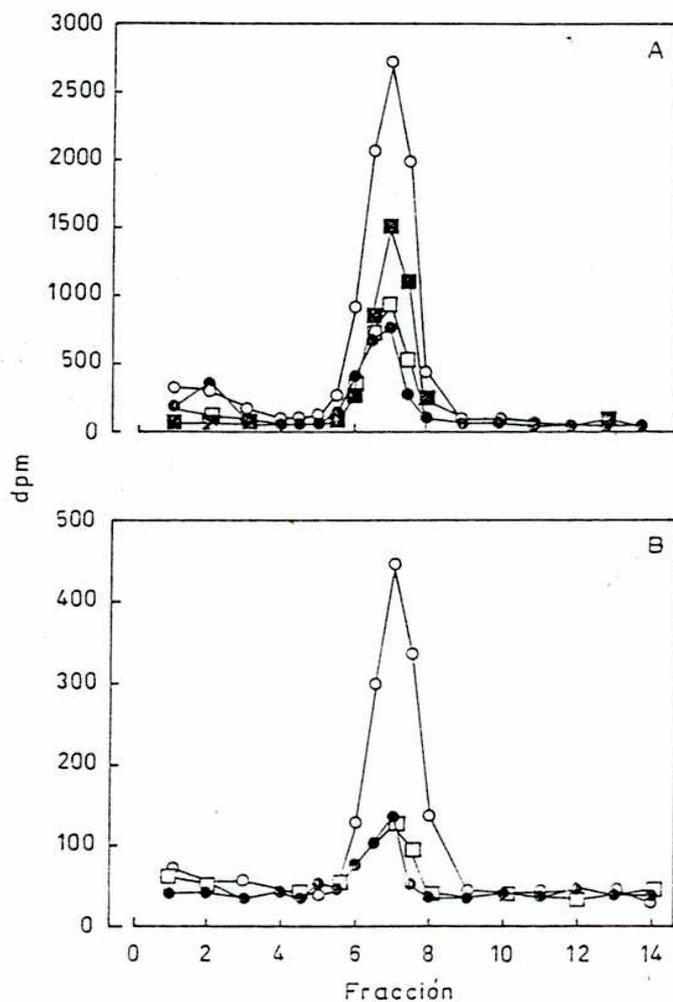


Figura II.3: Recuperación y análisis del GABA acumulado. Las células de la cepa D27 crecidas en medios MPM-Gli (A) y en MGABAM-Gli (B) fueron preincubadas durante 5 (●), 10 (□) y 30 (○) minutos con ^3H -GABA 1.0 mM. En la misma cromatografía se corrió una muestra de ^3H -GABA (■).

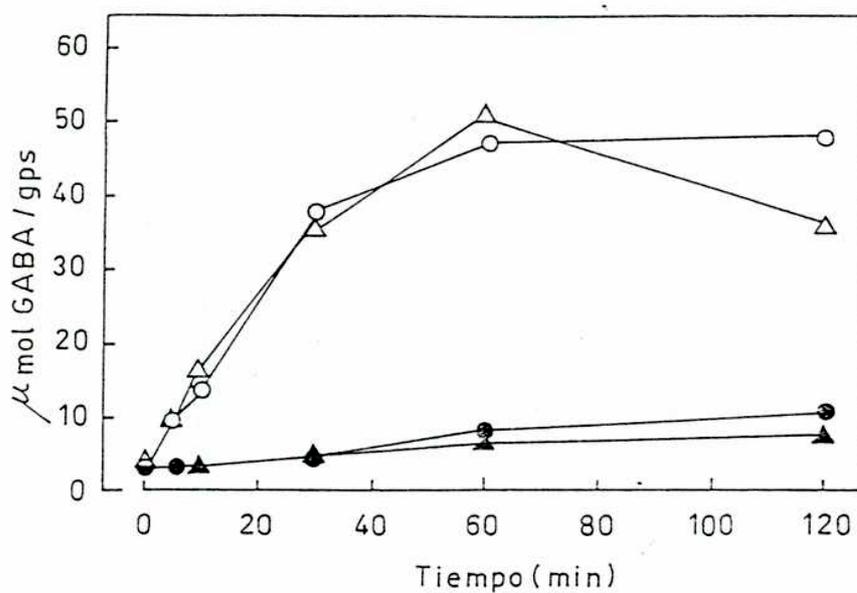


Figura II.4: Efecto de las fuentes de carbono y de nitrógeno sobre la incorporación de GABA. Las células de la cepa D27 crecieron en medios MPM-Gli (O), MPM-Gluc (●), MAM-Gli (Δ) y MAM-Gluc (▲).

Estos resultados parecen contradecir los obtenidos por Grenson y col. (1987) quienes demostraron que la permeasa UGA4 es inducible por el propio sustrato. Esto podría deberse, como ya se indicara, a las diferentes metodologías o cepas empleadas.

Por otro lado se debe destacar que han sido aisladas mutantes (*uga43*, *uga81*, *uga11*) en las cuales la permeasa específica de GABA (UGA4) no es inducible por su sustrato (Vissers y col., 1989; André y col., 1993). No se puede descartar la posibilidad de que la cepa D27 posea alguna mutación de este tipo.

II.5. Especificidad del sistema de transporte de GABA

Se determinó la velocidad inicial de incorporación de GABA en presencia de varios compuestos. En la Tabla II.II se muestran los resultados obtenidos.

Tabla II.II: Efecto de varios compuestos sobre el transporte de GABA

Compuesto	% de inhibición
ALA	30
citrulina	5
prolina	45
β -alanina	70
ác. malico	5

Las células crecieron en medio MPM-Gli. Se determinaron las velocidades iniciales en presencia de cada uno de estos compuestos (10 mM). La concentración de GABA externo fue 1.0 mM. La velocidad inicial control fue 1.4 $\mu\text{mol } ^3\text{H-GABA/gps.min.}$

El hecho de que la citrulina no inhiba el transporte de GABA, apoya la idea de que la cepa D27 es deficiente en la actividad de GAP.

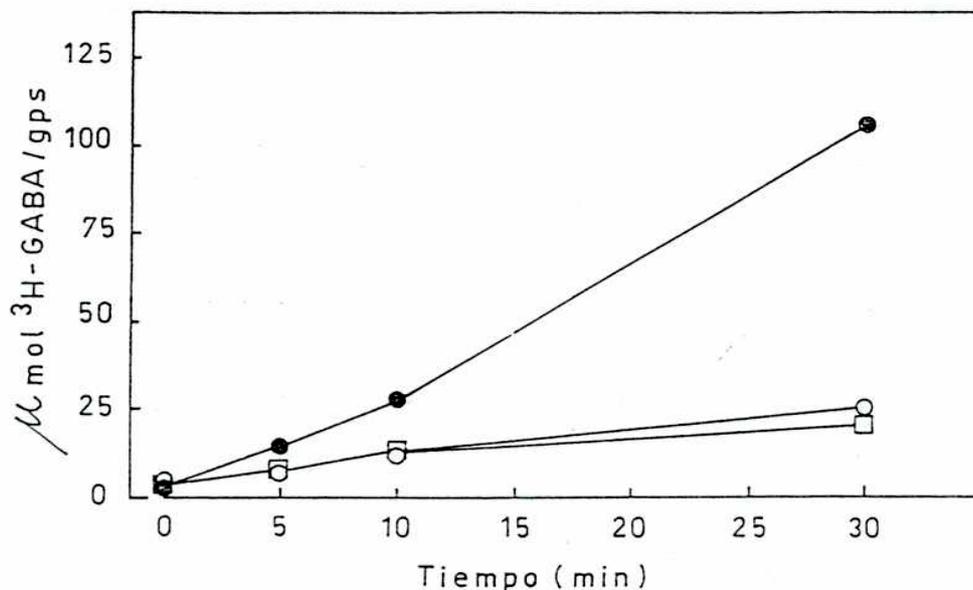


Figura II.5: Incorporación de GABA en células de la cepa D27 crecidas en presencia de GABA. Las células crecieron en medio MPM-Gli (●), MPM-Gli suplementado con GABA 5 mM (○) o GABA 10 mM (□).

Por otro lado, la inhibición de la entrada producida por prolina sugiere que el GABA está siendo incorporado, por lo menos en parte, por la permeasa PUT4.

La β -alanina produce una inhibición de la incorporación de GABA de un 70%. La inhibición por este

análogo de GABA ya había sido demostrada en cerebro de rata (Kanner y Bendaham, 1990).

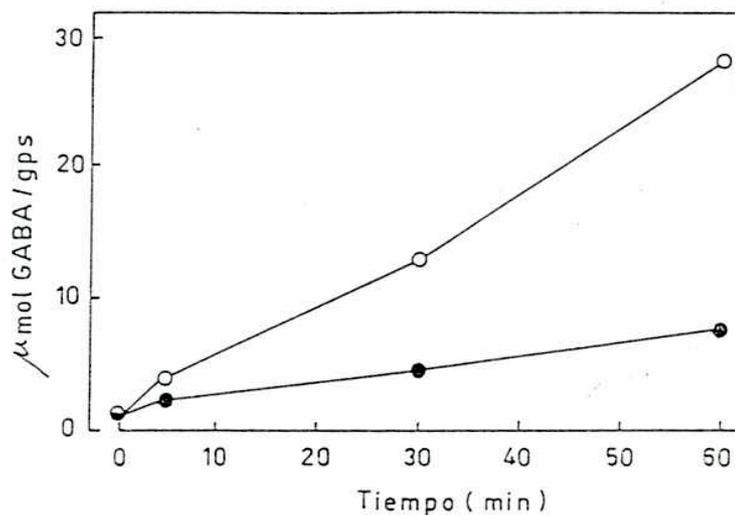


Figura II.6: Incorporación de GABA en células crecidas en un medio con GABA como única fuente de nitrógeno. Las células de la cepa D27 crecieron en medio MPM-Gli (O) y MGABAM-Gli (●).

También el ALA produce cierta inhibición sobre el transporte de GABA (30%).

Asimismo se realizaron ensayos de inhibición con malato ya que se había propuesto que en algunos organismos el ALA es incorporado por la permeasa específica de este compuesto (Herrada y col., 1992). Sin embargo, malato no

tiene ningún efecto sobre el transporte de GABA en esta cepa de *S. cerevisiae*.

II.6. Estudios cinéticos

La incorporación de GABA en función de su concentración externa muestra un perfil hiperbólico (Figura II.7). La relación de las dobles recíprocas es lineal, sugiriendo que la incorporación se produce por un único sistema.

Los valores de K_T y $V_{m\acute{a}x}$ obtenidos fueron $48 \mu M$ y $1.1 \mu mol \text{ } ^3H\text{-GABA/gps.min}$, respectivamente.

Al ser la D27 una cepa defectiva en la actividad de GAP, el GABA se incorporaría en esta cepa mediante las permeasas PUT4 y UGA4. El hecho de que cinéticamente se detecte un solo sistema de transporte puede deberse a que estas dos permeasas tienen parámetros cinéticos similares o a la ausencia de actividad de PUT4 en células crecidas en medio MPM (Grenson y col., 1987). Como se mencionó anteriormente, la prolina inhibe la incorporación de GABA (45%), lo cual apoyaría la primera de estas dos hipótesis.

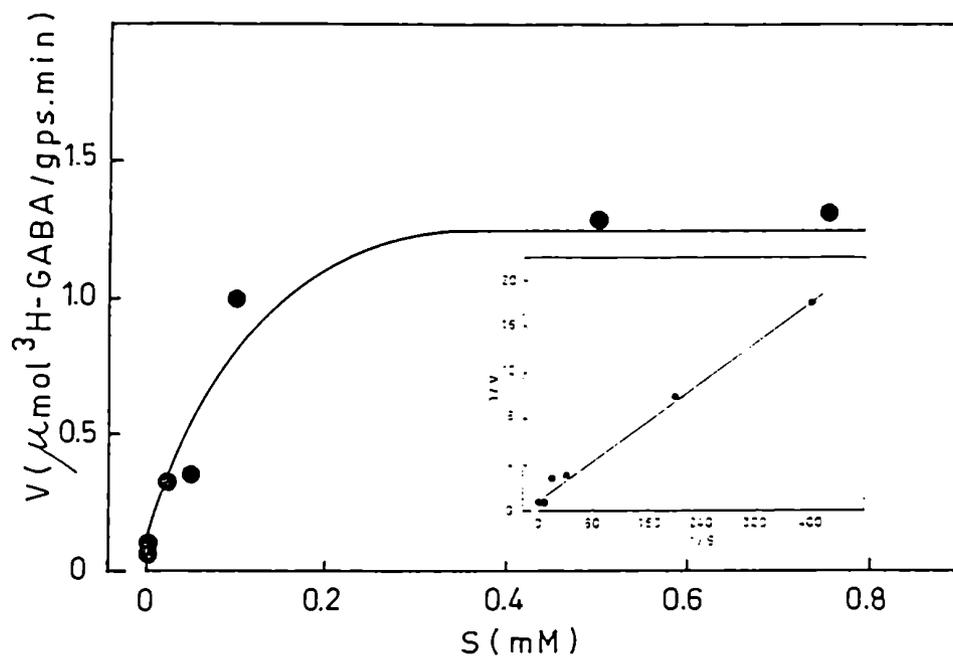


Figura II.7: Cinética de entrada de GABA en células de la cepa D27 crecidas en medio MPM-Gli.
Inset: Representación de Lineweaver-Burk.

II.7. Conclusiones

En este capítulo se describe la caracterización del sistema de transporte de GABA en la cepa D27 de *S. cerevisiae*. Se determinó que:

- la cepa D27, así como la D27/C6, es deficiente en la actividad de GAP, una de las tres permeasas que transportan GABA

- el GABA incorporado no es metabolizado durante los primeros 30 minutos de incubación
- la fuente de carbono regula el transporte de GABA
- la incorporación de GABA en la cepa D27 no es sensible a la fuente de nitrógeno
- el GABA presente en el medio de crecimiento regula su propio sistema de transporte
- el transporte de GABA es inhibido por la presencia de β -alanina, ALA y prolina
- mediante estudios cinéticos se detectó un único sistema de transporte de GABA con un K_T de 48 μ M

RELACION ENTRE LOS SISTEMAS DE TRANSPORTE DE ALA Y GABA

	Página
III.1. Transporte de ALA	102
III.1.1. Tipo de inhibición por GABA	102
III.1.2. Incorporación de ALA en células crecidas en presencia de GABA	103
III.1.3. Incorporación de ALA en células bajo diferentes condiciones de crecimiento	106
III.2. Transporte de GABA	108
III.2.1. Tipo de inhibición por ALA	108
III.2.2. Incorporación de GABA en células crecidas en presencia de ALA	109
III.3. Conclusiones	111

III. RELACION ENTRE LOS SISTEMAS DE TRANSPORTE DE ALA y GABA

Los ensayos de inhibición de los sistemas de transporte de ALA y GABA sugirieron que ambos compuestos podrían utilizar una misma permeasa para ingresar a las células y que probablemente, la permeasa compartida sea la específica para GABA, UGA4.

Se intentó, entonces, esclarecer la relación entre ambos sistemas de transporte.

III.1. Transporte de ALA

III.1.1. Tipo de inhibición por GABA

Se decidió estudiar el tipo de inhibición producida por el GABA sobre el transporte de ALA.

Para ello, se realizó en primer lugar una curva de inhibición de la incorporación de ALA en función de la concentración de GABA (Figura III.1).

A partir de esta curva se decidió calcular los parámetros cinéticos de la incorporación de ALA en presencia de GABA 0.05 mM.

En la Figura III.2 se muestra que la inhibición producida por GABA es de tipo competitivo con un K_i aparente de 0.014 mM.

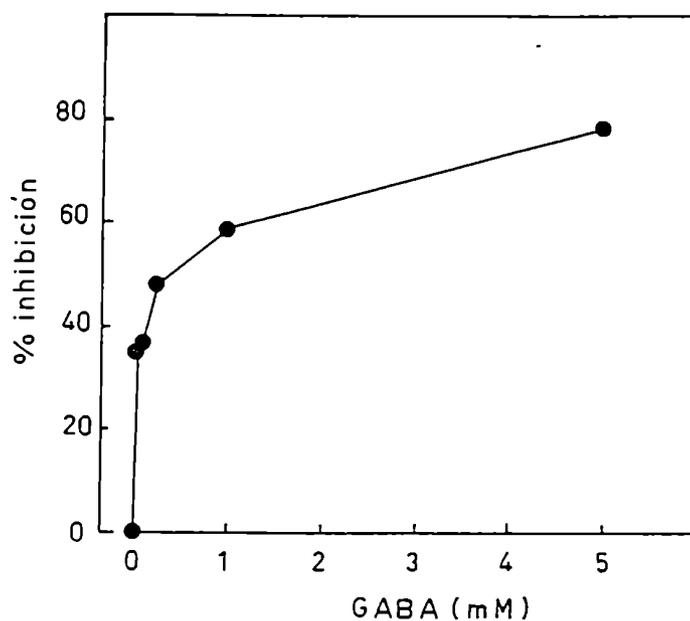


Figura III.1: Efecto de GABA sobre el transporte de ALA. Las células de la cepa D27 crecieron en medio MPM-Gli.

III.1.2. Incorporación de ALA en células crecidas en presencia de GABA

La mayoría de las permeasas de aminoácidos en *S. cerevisiae* están sujetas a inhibición por "feedback" (Wiame y col., 1984). Esta regulación es ejercida tanto por el sustrato acumulado intracelularmente, como por otros compuestos que utilicen el mismo sistema de transporte (Gits y Grenson, 1969).

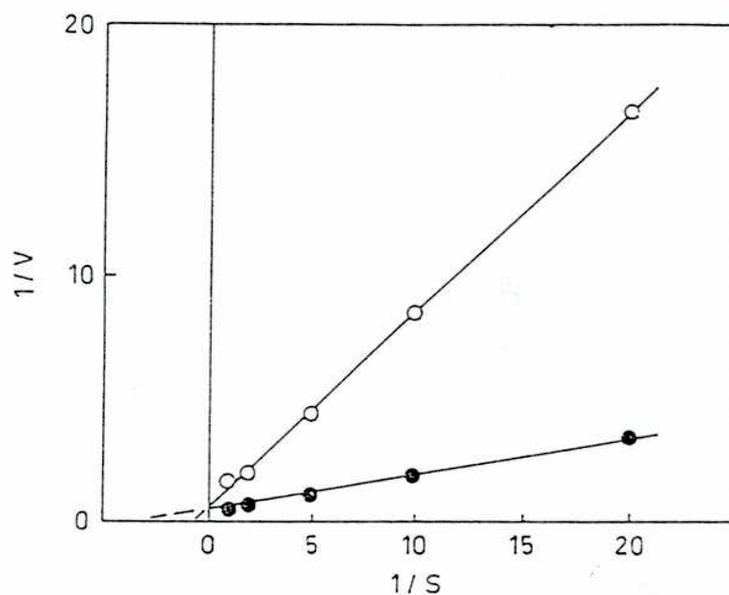


Figura III.2: Cinética de entrada de ALA. Representación de Lineweaver-Burk.

La entrada de ALA se determinó en presencia (O) o ausencia (●) de GABA. Las células crecieron en medio MPM-Gli.

Por este motivo, se decidió estudiar el efecto de la presencia de GABA durante el crecimiento celular sobre el transporte de ALA.

Se determinó la incorporación de ALA en células de la cepa D27 crecidas en MPM-Gli suplementado durante todo el crecimiento o sólo durante la última hora de crecimiento con GABA 5 mM o crecidas en MGABAM-Gli.

La incorporación de ALA en células crecidas en presencia de GABA durante todo el crecimiento se encuentra fuertemente inhibida. Sin embargo, cuando las células estuvieron en contacto con GABA durante solamente la última hora de crecimiento, el transporte de ALA se inhibe apenas un 20% (Figura III.3).

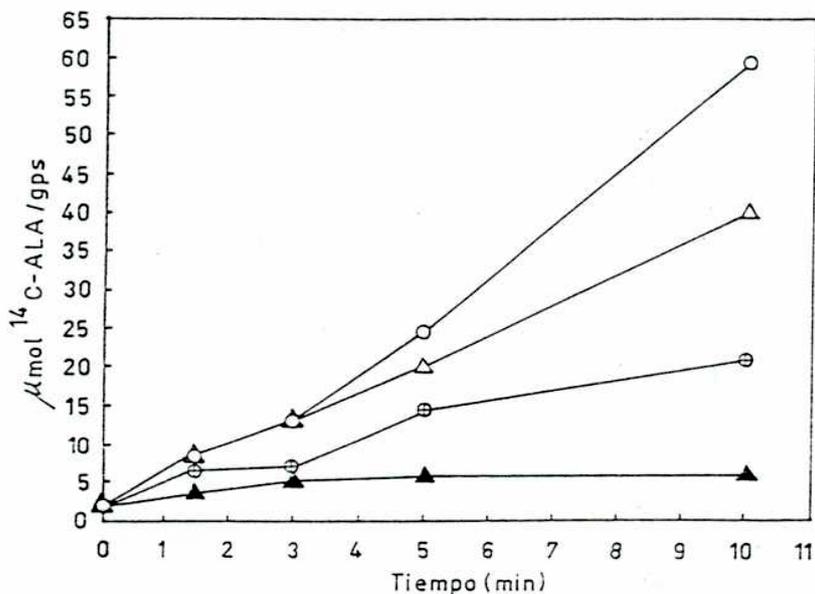


Figura III.3: Incorporación de ALA en células crecidas en presencia de GABA. Las células crecieron en medio MPM-Gli (O), MPM-Gli suplementado con GABA 5 mM durante todo el crecimiento (▲) o sólo durante la última hora (Δ) y en MGABAM-Gli (⊕).

El GABA presente en el medio de cultivo como única fuente de nitrógeno también produce una fuerte inhibición de la incorporación de ALA (Figura III.3).

Estos resultados demuestran que el GABA acumulado intracelularmente puede regular el transporte de ALA, lo que sugiere nuevamente que ambos compuestos comparten una misma proteína transportadora.

III.1.3. Incorporación de ALA en células bajo diferentes condiciones de crecimiento

Casi todas las rutas metabólicas están influenciadas por las condiciones fisiológicas de las células, entre ellas, la biosíntesis de porfirinas en la cepa D27 de *S. cerevisiae* (Correa García y col., 1993). Para determinar si el sistema de transporte de ALA también se encuentra afectado por el estado fisiológico de las células, se midió la incorporación de ALA en células de la cepa D27 crecidas en diferentes medios de cultivo y en distintas fases de crecimiento.

A pesar de que no se encuentran diferencias significativas entre los niveles de ALA intracelular presentes en cada caso (Tabla III.I), en células crecidas en MPM-Gli y cosechadas en la fase lag de crecimiento (5 horas) se detecta muy poca incorporación de ALA, mientras que las células en las fases de crecimiento exponencial y

exponencial tardía (16 y 22 horas, respectivamente) presentan similares actividades del sistema de transporte de ALA (Figura III.4).

Tabla III.I: ALA intracelular

	Tiempo de crecimiento (horas)		
	5	16	22
MPM-Gli	0.05	0.07	0.06
MPM-Gli+ALA 1 mM	-	-	2.64
MPM-Gli+ALA 5 mM	-	10.00	7.00
MPM-Gli+ALA 5 mM*	-	-	1.55
MPM-Gli+GABA 5 mM	-	0.08	0.04
MGABAM-Gli	-	0.05	0.09

Los valores se expresan en nmol ALA/mgps.

* ALA agregado 2 horas antes de cosechar.

Sin embargo, cuando el sistema de transporte está reprimido (células crecidas en presencia de ALA o GABA), la fase de crecimiento no tiene influencia (Figura III.4).

De esta manera, se determinó que el transporte del precursor en la biosíntesis de porfirinas, así como la biosíntesis misma dependen de la fase de crecimiento.

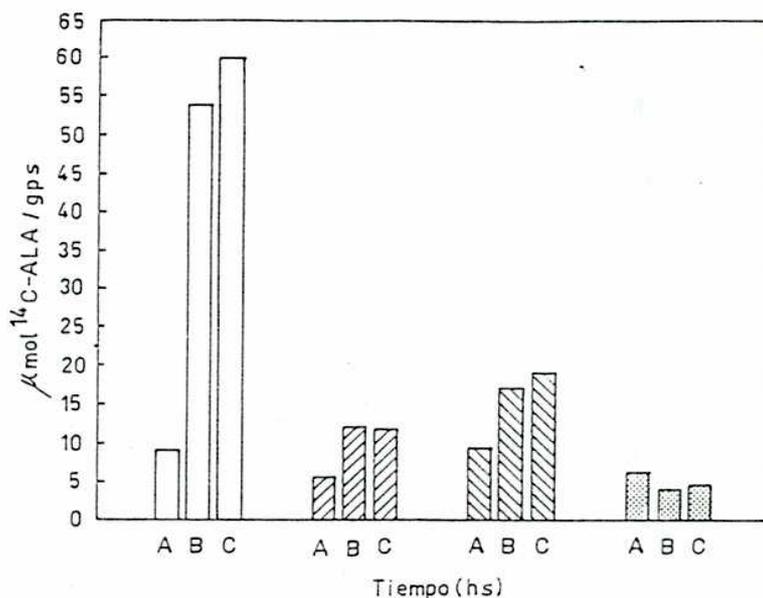


Figura III.4: Incorporación de ALA en células bajo diferentes condiciones de crecimiento. Las células crecieron en medio MPM-Gli (□), MPM-Gli suplementado con ALA 5 mM (▨) o con GABA 5 mM (▩) y en MGABAM-Gli (▤) durante 5 (A), 16 (B) y 22 (C) horas. La incorporación de ALA se midió luego de una incubación de 10 minutos.

III.2. Transporte de GABA

III.2.1. Tipo de inhibición por ALA

A partir de la curva de inhibición del transporte de GABA en presencia de distintas concentraciones de ALA (Figura III.5) se decidió determinar los parámetros cinéticos del transporte de GABA en presencia de ALA 0.5 mM.

En este caso, la inhibición también fue de tipo competitivo con un K_i aparente de 0.5 mM (Figura III.6).

III.2.2. Incorporación de GABA en células crecidas en presencia de ALA

De la misma manera que el GABA intracelular regula la incorporación de ALA, el ALA intracelular controla el transporte de GABA (Figura III.7), si bien su efecto es algo menor que el del GABA sobre el transporte de ALA.

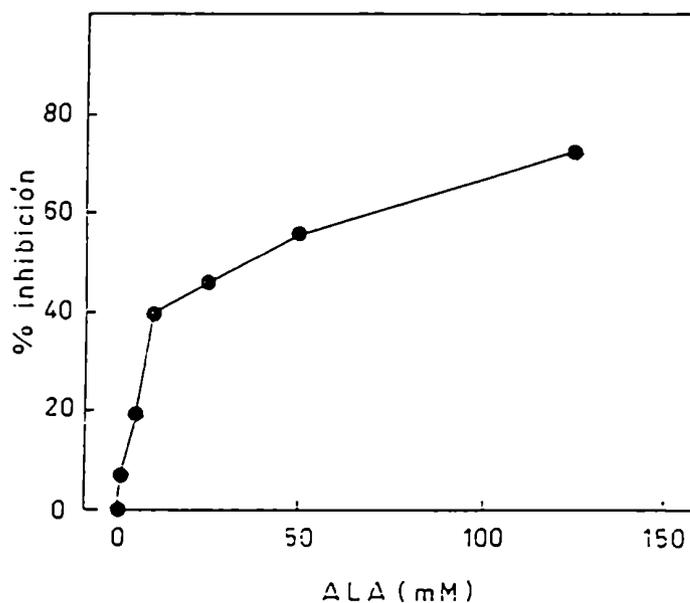


Figura III.5: Efecto de ALA sobre el transporte de GABA. Las células crecieron en medio MPM-Gli.

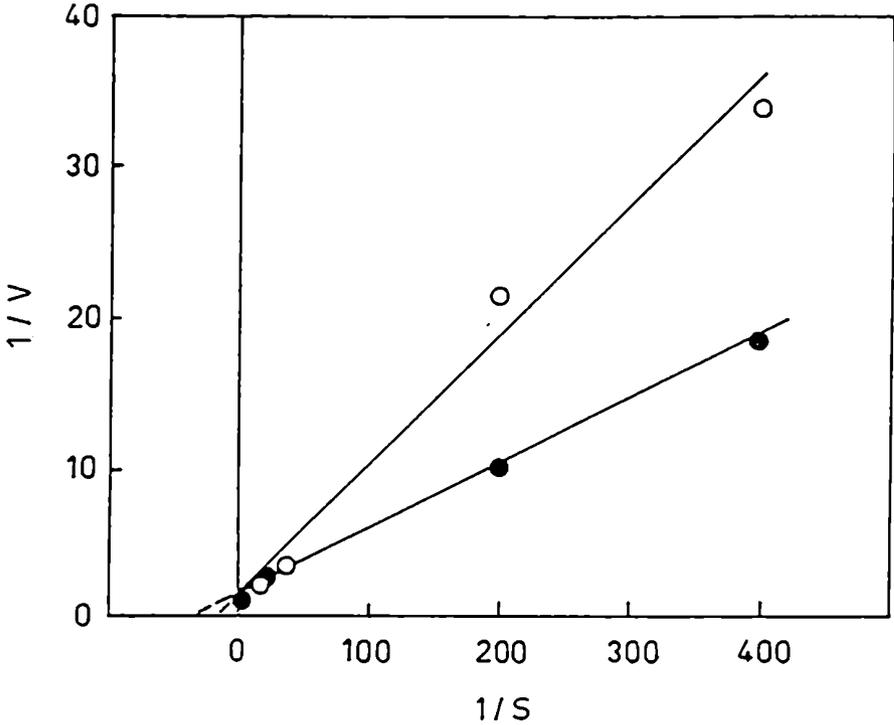


Figura III.6: Cinética de la entrada de GABA. Representación de Lineweaver-Burk. La entrada de GABA se determinó en células crecidas en presencia (O) o ausencia (●) de ALA. Las células crecieron en medio MPM-Gli.

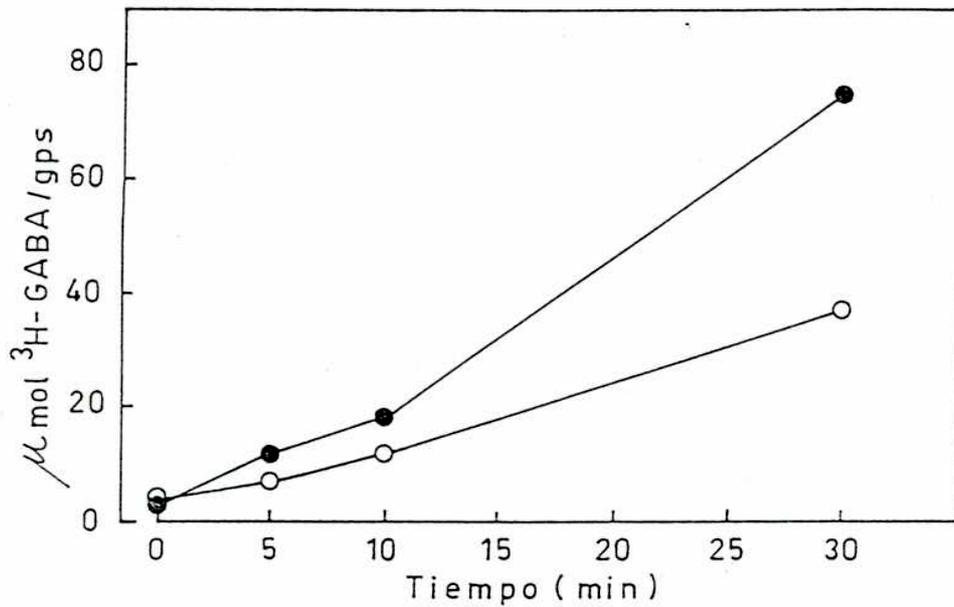


Figura III.7: Incorporación de GABA en células crecidas en presencia de ALA. Las células crecieron en medio MPM-Gli (●) y MPM-Gli suplementado con ALA 1 mM (○).

III.3. Conclusiones

En este capítulo se describe la relación entre los sistemas de transporte de ALA y de GABA. Se determinó que:

- . el GABA inhibe competitivamente la incorporación de ALA, con un K_i aparente de 0.014 mM

- . la presencia de GABA en el medio de crecimiento regula el transporte de ALA

. el ALA ejerce inhibición competitiva sobre la incorporación de GABA con un K_i de 0.5 mM

. la presencia de ALA en el medio de crecimiento regula el transporte de GABA

TRANSPORTE DE ALA EN CEPAS *hem1*

	Página
IV.1. Curvas de crecimiento	114
IV.2. Incorporación de ALA	115
IV.3. Diferentes condiciones de crecimiento	116
IV.4. Actividades enzimáticas	117
IV.5. Sistemas de transporte	119
IV.5.1. Determinación de la presencia de la mutación <i>gap</i>	121
IV.5.2. Especificidad del sistema de transporte de ALA en la cepa WR3-R3	122
IV.6. Efecto de compuestos que inhiben el transporte de ALA sobre el crecimiento celular	123
IV.7. Conclusiones	125

IV. TRANSPORTE DE ALA EN CEPAS *hem1*

Luego de haber caracterizado exhaustivamente el sistema de transporte de ALA en *S. cerevisiae*, se intentará obtener mutantes deficientes en esta permeasa para posteriormente clonar el gen que codifica para la proteína transportadora de ALA.

Ya han sido aisladas numerosas mutantes deficientes en transportadores de aminoácidos, sin que se encuentren alteradas las enzimas involucradas en su metabolización. Un método simple para aislar este tipo de mutantes se basa en su resistencia a análogos tóxicos. Cuando no se dispone de análogos tóxicos, las mutantes se detectan por su incapacidad de usar un aminoácido requerido ya sea para su crecimiento o como única fuente de nitrógeno.

Como no se conoce ningún análogo tóxico de ALA que se transporte por el mismo sistema y el ALA no puede ser utilizado como fuente de nitrógeno, se decidió emplear como cepa parental para la mutagénesis, mutantes *hem1*, deficientes en la actividad de la enzima ALA-S, que requieren en consecuencia ALA para su crecimiento.

Para ello fue imprescindible realizar una primera caracterización de estas cepas y determinar las condiciones en las cuales se procedería para seleccionar las mutantes.

Se utilizaron las siguientes cepas *hem1*: WR3-R3, WR3-R1, W1, MA24-RS21 y BR13-10C.

IV.1. Curvas de crecimiento

Se realizaron las curvas de crecimiento de las cepas deficientes en ALA-Sintetasa crecidas en MPM-Gli suplementado con ALA 1 mM. Los tiempos de generación (G) calculados a partir de estas curvas (Tabla IV.I) son muy largos comparados con los de las cepas silvestres (200-400 min). Probablemente, la presencia de la mutación *hem1* en todas estas cepas dificulta su crecimiento.

Tabla IV.I: Tiempos de generación (G)

Cepa	G (horas)
WR3-R1	21
WR3-R3	13
W1	14
MA24-RS21	22
BR13-10C	19

Los tiempos de generación se calcularon como se indica en Materiales y Métodos.

En vista de los resultados obtenidos se resolvió continuar trabajando con la cepa WR3-R3 por ser la que mostró mayor crecimiento y la W1 por ser una cepa con pocos requerimientos.

IV.2. Incorporación de ALA

Se midió la incorporación de ALA en células de las cepas WR3-R3 y W1 crecidas en medio MPM-Gli suplementado con ALA 1 mM.

Luego de 10 minutos de incubación, el ALA se concentró intracelularmente entre 5 y 7 veces (Figura IV.1). Es decir, que en ambas cepas el sistema de transporte de ALA se encuentra en estado funcional.

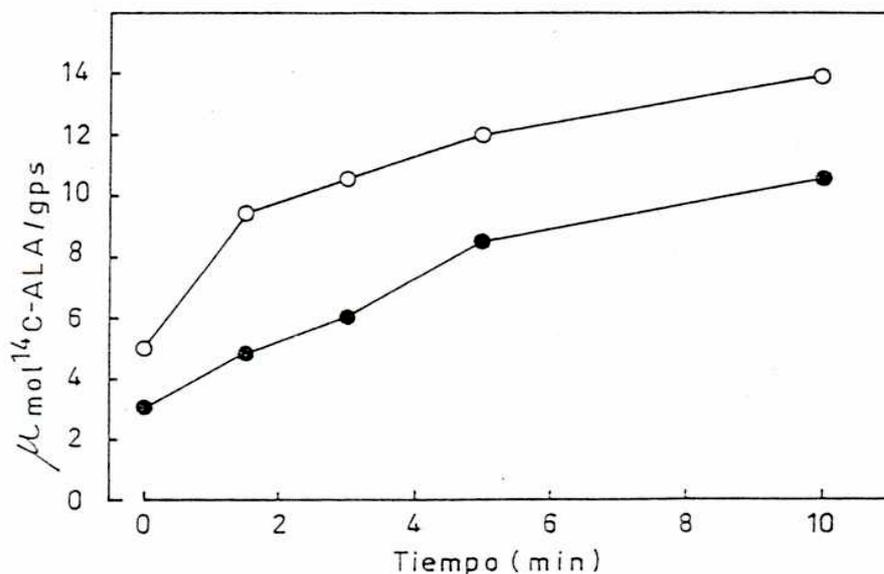


Figura IV.1: Incorporación de ALA en células de las cepas W1 y WR3-R3.
Las células de las cepas W1 (O) y WR3-R3 (●) crecieron en medio MPM-Gli.

IV.3. Diferentes condiciones de crecimiento

Con el fin de aislar una mutante con el translocador alterado, se deben determinar las condiciones en las cuales el crecimiento de una mutante *hem1* dependa de la actividad del translocador.

En primer lugar se determinó la mínima concentración de ALA que permite la formación del máximo tamaño de colonia. Con este fin, las células se hicieron crecer en placas con medio YPGli suplementado con diferentes concentraciones de ALA entre 0 y 1 mM. El medio empleado fue YPGli porque el crecimiento celular en este medio requiere la producción de citocromos.

Sólo se observó crecimiento en placas con medio suplementado con una concentración de ALA mayor o igual a 0.2 mM. Sin embargo, con esta concentración las colonias obtenidas son pequeñas; por lo tanto, se decidió utilizar una concentración de ALA de 0.3 mM.

Por otro lado, se quiso determinar la mínima concentración de ALA que permite el crecimiento de estas cepas en varios medios líquidos (YPD, YPGli, MPM-Gli). Sorprendentemente, estas cepas crecieron aún sin el agregado de ALA al medio de cultivo.

Como el crecimiento frente a distintas concentraciones de ALA es similar en ambas cepas y la incorporación de ALA es mayor en la cepa WR3-R3 que en la W1, se empleará la cepa WR3-R3 para obtener la mutante deficiente en el transporte de ALA.

IV.4. Actividades enzimáticas

El hecho de que la cepa WR3-R3 creciera en medios líquidos sin suplementar con ALA llevó a la necesidad de confirmar la presencia de la mutación *hem1* mediante la medición de la actividad de la enzima ALA-S.

Paralelamente, se midió la actividad de ALA-D y el contenido de ALA intracelular. Las células se hicieron crecer en medio YPGli suplementado con ALA 1mM.

Se utilizó como control la cepa D27, normal en la síntesis de citocromos.

La actividad de ALA-S en la cepa WR3-R3 es muy baja, 5 veces menor que en la cepa D27 (Tabla IV.II).

Además, en la cepa mutante hay una gran acumulación de ALA intracelular, que se correlaciona con una actividad de ALA-D también disminuída (Correa García y col., 1993).

De esta manera, se corroboró la presencia de la mutación *hem1*.

Tabla IV.II: Actividades enzimáticas

	ALA-S	ALA-D	ALA-I
WR3-R3	0.3	0.3	21.5
D27	1.5	1.1	1.6

Los valores se expresan en nmol ALA/mg prot, nmol PBG/mg prot y nmol ALA/mgps para las actividades de ALA-S, ALA-D y para el contenido de ALA-I, respectivamente.

Para explicar el crecimiento observado en ausencia de ALA exógeno se hicieron varios repiques en medios líquidos sin suplementar, a partir de un cultivo inicial de la cepa WR3-R3 en medio MPM-Gli suplementado con ALA 1 mM. En cada paso se determinó el crecimiento midiendo la absorbancia a 570 nm y el contenido de ALA intracelular (Figura IV.2). Se observa que en los sucesivos repiques el ALA-I va disminuyendo y que al tercer repique el crecimiento es casi nulo. Se comprobó de esta forma, que el crecimiento en medio líquido sin suplementar con ALA que se había observado para esta cepa, se debe a la utilización del ALA acumulado previamente en las células; a medida que se va agotando disminuye o se detiene su desarrollo.

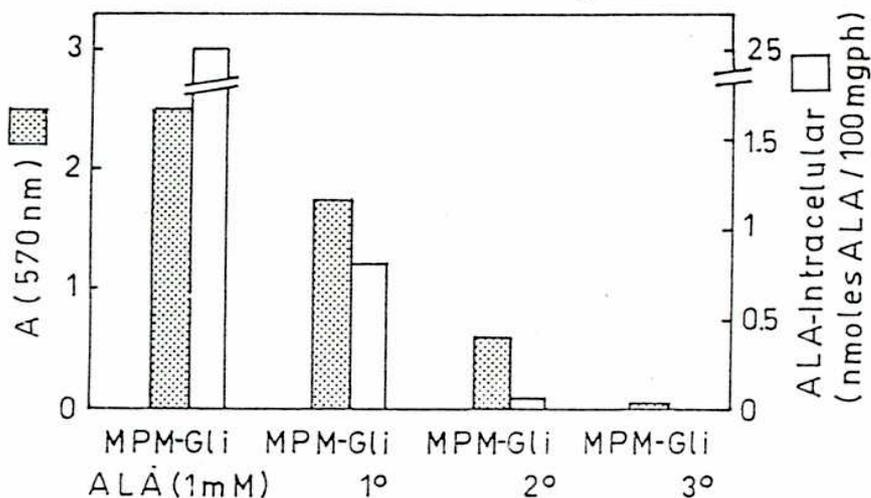


Figura IV.2: Crecimiento celular y ALA intracelular en sucesivos repiques.

Las células crecieron en medio MPM-Gli suplementado con ALA 1 mM y los repiques sucesivos se hicieron en medio MPM-Gli sin suplementar con ALA.

IV.5. Sistemas de transporte

Se estudió la incorporación de citrulina y GABA en la cepa WR3-R3. Como se muestra en la Figura IV.3 esta cepa es capaz de incorporar GABA aunque con una velocidad inicial menor que la cepa D27 (Tabla IV.III).

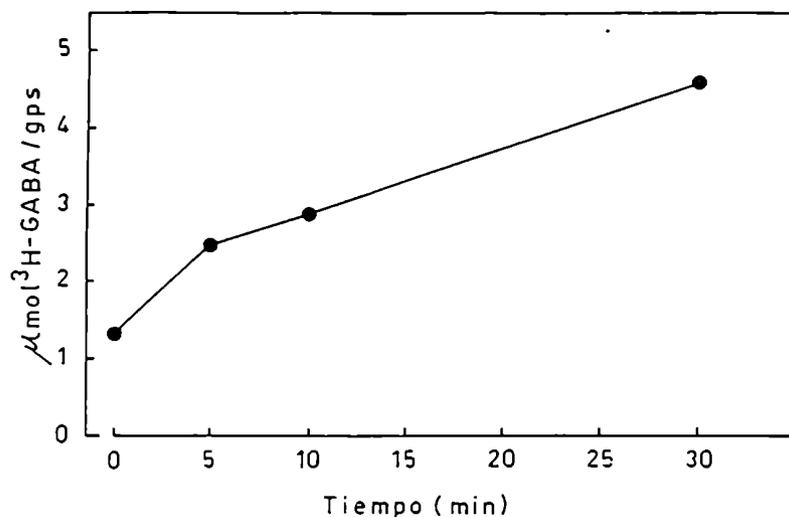


Figura IV.3: Incorporación de GABA en células de la cepa WR3-R3.
Las células crecieron en medio MPM-Gli.

Tabla IV.III: Velocidad inicial de transporte de ALA, GABA y citrulina

	ALA		GABA		Citrulina	
	D27	WR3-R3	D27	WR3-R3	D27	WR3-R3
MPM-Gli	3.00	-	3.65	-	0.01*	-
MPM-Gli+ALA	0.92	0.23	2.10	0.40	-	0.02*

Los valores se expresan en $\mu\text{mol } ^{14}\text{C-ALA/gps.min}$, $\mu\text{mol } ^3\text{H-GABA/gps.min}$ y $\mu\text{mol } ^{14}\text{C-citrulina/gps.min}$ para las velocidades iniciales de incorporación de ALA, GABA y citrulina respectivamente. *células crecidas en medio MPM-Gluc 2%.

Además se determinó que esta cepa *hem1* es incapaz de incorporar citrulina (Figura IV.4; Tabla IV.III).

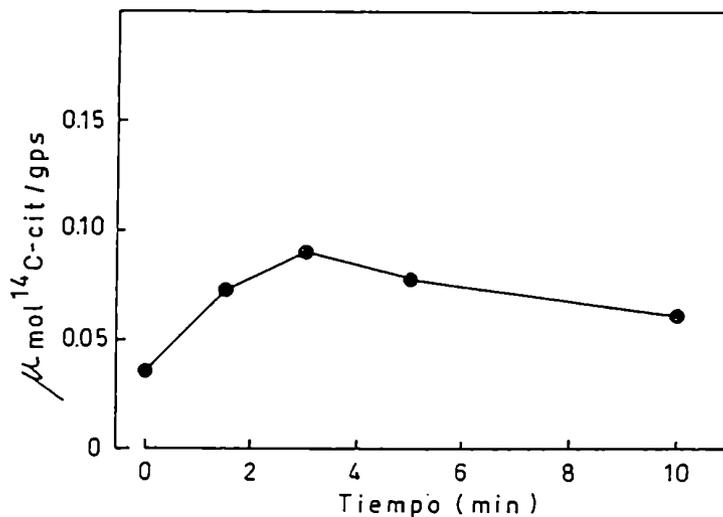


Figura IV.4: Incorporación de citrulina en células de la cepa WR3-R3. Las células crecieron en medio MPM-Gluc 2%. La concentración externa de citrulina fue 0.05 mM.

IV.5.1. Determinación de la presencia de la mutación *gap*

Como los ensayos de incorporación de citrulina sugirieron la presencia de una mutación *gap* en la cepa WR3-R3, se decidió comparar su crecimiento con el de otras con actividad de GAP conocida. Se confirmó así que la GAP es inactiva en dicha cepa (Tabla IV.IV).

Tabla IV.IV: Crecimiento celular en placas

	WR3-R3	MMY2	MMY2/H3	2512c
MPM-Gli	+	++	+	++
MM-Gli	-	-	-	-
McitM-Gli	-	+	-	-
MPM-Gli+D-his	+	-	+	++

La concentración de citrulina agregada fue 1.0 mM y la de D-histidina 10 mM. El medio MM-Gli, que no contiene fuente de nitrógeno, se utilizó como control negativo.

IV.5.2. Especificidad del sistema de transporte de ALA en la cepa WR3-R3

Para determinar si la especificidad del sistema de transporte de ALA en la cepa WR3-R3 es similar a la de la cepa D27, se midió la incorporación de ALA en la cepa WR3-R3 en presencia de varios compuestos.

Los resultados obtenidos señalan una especificidad del sistema de transporte de ALA similar en ambas cepas (Tabla IV.V).

Tabla IV.V: Inhibición del transporte de ALA por varios compuestos

Compuesto	% de inhibición
GABA	70
β -alanina	69
ác. ϵ -aminocaproico	59
ornitina	60
citrulina	20
prolina	10

Las células crecieron en medio MPM-Gli. La concentración externa de ALA fue 1.0 mM y la de los compuestos ensayados 10 mM. El valor control fue 14 μ mol 14 C-ALA/gps.

IV.6. Efecto de compuestos que inhiben el transporte de ALA sobre el crecimiento celular

Teniendo en cuenta que la cepa *hem1* WR3-R3 requiere ALA para crecer y que *in vitro* varios compuestos inhiben la incorporación de ALA, se resolvió estudiar el efecto de estos compuestos sobre el crecimiento celular de esta cepa.

Para ello, se sembró la cepa WR3-R3 en placas con medio YPGli suplementado o no con ALA y/o cada uno de los compuestos ensayados. Luego, se analizó la formación de colonias en cada placa. En la Tabla IV.VI se muestran los resultados obtenidos.

Tabla IV.VI: Efecto de diferentes compuestos sobre el crecimiento celular

Placa	ALA (mM)	GABA (mM)	ornitina (mM)	ε-aminocap. (mM)	Crecim.
1	-	-	-	-	-
2	0.3	-	-	-	+
3	0.3	-	-	12	+
4	0.3	-	12	-	+
5	0.3	12	-	-	+
6	-	-	-	12	-
7	-	-	12	-	-
8	-	12	-	-	+

Las células crecieron en placas con medio YPGli con los suplementos indicados.

El crecimiento celular de esta cepa en presencia de GABA, ornitina y ácido ε-aminocaproico no se ve disminuido respecto del control.

Por otra parte, se vió que estos tres compuestos inhiben fuertemente el transporte de ALA *in vitro*. Estos resultados parecen contradecirse; sin embargo, debe destacarse que las condiciones de ambos experimentos son bastante diferentes:

i) en un caso, las células se encuentran en medio de crecimiento sólido mientras que en el otro, se trabajó con células resuspendidas en buffer ftalato de potasio;

ii) el tiempo de contacto de las células con el ALA y/o cada uno de estos compuestos en un caso es de una semana mientras que en el otro es de 5 minutos;

iii) en un caso se trabaja *in vivo* y en el otro *in vitro*.

Por lo tanto, los resultados de estos dos ensayos no serían comparables.

Además, si bien estos compuestos inhiben el transporte de ALA, posiblemente la pequeña cantidad de ALA que se incorpore permita el normal crecimiento celular.

IV.7. Conclusiones

En este capítulo se caracteriza una mutante deficiente en la actividad de ALA-S (WR3-R3) a partir de la cual se intentará obtener mutantes deficientes en el transporte de ALA. Se determinó que:

- . la cepa es deficiente en ALA-S
- . la mínima concentración de ALA que permite un buen crecimiento celular en medio YPGli es 0.3 mM
- . esta cepa es deficiente en la actividad de GAP mientras que los sistemas de transporte de ALA y de GABA son funcionales
- . la especificidad del sistema de transporte de ALA en esta cepa es similar al descrito para la D27
- . la inhibición de la incorporación de ALA por varios compuestos detectada *in vitro* no se manifiesta a nivel de crecimiento celular

DISCUSSION

DISCUSION

Este trabajo constituye la primera caracterización del sistema de transporte del ácido δ -aminolevulínico (ALA), precursor del camino biosintético de las porfirinas, en un organismo eucariótico simple como es la levadura *Saccharomyces cerevisiae*.

Se demostró que el ALA sufre transporte concentrativo en las cepas empleadas, aún cuando no requieran ALA para su crecimiento.

Como ya ha sido observado para otros sistemas de transporte de aminoácidos (Roon y col., 1975, 1977), la fuente de nitrógeno también regula el transporte de ALA en levaduras. No se detectó incorporación cuando se empleó una fuente rica de nitrógeno (amonio).

De la misma forma en que la glucosa reprime la biosíntesis de citocromos (Jayaraman y col., 1972; Labbe-Bois y Volland, 1977; Borralho y col., 1983; Correa García y col., 1993), también controla el transporte de ALA.

En consecuencia, la incorporación de ALA en levadura está seriamente influida por las fuentes de carbono y de nitrógeno, sugiriendo que su regulación debe ser compleja.

Como ya se ha observado para la mayoría de los aminoácidos (Grenson, 1992) se ha demostrado aquí que el

flujo de ALA también es unidireccional y que no ocurre eflujo ni intercambio con ALA extracelular.

De los estudios cinéticos y de inhibición, se ha detectado la existencia de un único sistema transportador de ALA. También se ha determinado en este trabajo que las cepas utilizadas, D27 y D27/C6, son deficientes en la permeasa general de aminoácidos (GAP). En consecuencia, por el momento nuestros resultados no permiten descartar la posibilidad de que el ALA pueda incorporarse a las células a través de la GAP.

El K_T aparente calculado para el sistema de transporte de ALA es de 0.1 mM, este valor es menor que el hallado por Herrada y col. (1992) en *Rhizobium*.

La inactivación del sistema de transporte de ALA por conocidos inhibidores del metabolismo energético indica que se trata de un proceso dependiente de energía.

Los estudios de especificidad mostraron que la incorporación de ALA está fuertemente inhibida por compuestos que poseen un grupo metil-amino terminal, sugiriendo que este grupo es esencial para el transporte de ALA. Sin embargo, la inhibición ocurre cuando este grupo se encuentra en las posiciones γ , δ o ϵ mientras que no hay inhibición si se encuentra en α . Otro hecho interesante es que la presencia del grupo carboxilo en ausencia del grupo

α -amino es importante para la actividad del translocador; es decir que el entorno del grupo carboxilo es esencial para la interacción entre el ALA y el sitio activo de la proteína translocadora.

Cheeks y Wedeen (1986) demostraron que en túbulo proximal de riñón de rata, el ALA comparte su sistema de transporte, por lo menos en parte, con el ácido p-aminohipúrico. En cambio, en *S. cerevisiae* este compuesto no tiene efecto sobre la incorporación de ALA.

También Herrada y col. (1992) determinaron que en *Rhizobium*, el ALA utiliza el sistema de transporte del malato para su incorporación a las células. En este trabajo se ha demostrado que el malato no inhibe la incorporación de ALA en *S. cerevisiae*, de manera que en este organismo ambos compuestos se transportan por sistemas diferentes.

Recientemente, Elliot (1993) y Verkamp y col. (1993) propusieron que, tanto en *Salmonella typhimurium* como en *Escherichia coli*, el ALA se transporta a través de la permeasa de dipéptidos, debido a su parecido estructural con la glicil-glicina. Si bien se ha encontrado aquí que la glicil-glicina inhibe un 50% la incorporación de ALA también se ha observado que la regulación del sistema de transporte de ALA es completamente diferente a la encontrada por aquellos autores. Es decir que, en *S. cerevisiae*, el ALA y

la glicil-glicina no compartirían el mismo sistema de transporte.

En *S. cerevisiae*, el ácido γ -aminobutírico (GABA) es el compuesto que más fuertemente inhibe la incorporación de ALA, y se ha visto que esta inhibición es competitiva (K_i 0.014 mM), lo cual sugiere que ambos compuestos comparten un mismo sistema de transporte. El hecho de que la incorporación de dos compuestos con funciones biológicas tan diferentes compartan una misma permeasa y puedan así sufrir igual regulación es sumamente llamativo y debe ahondarse su estudio.

En consecuencia se trató de determinar la validez de esta hipótesis; para ello se comenzó por realizar un estudio de caracterización del transporte de GABA en la cepa D27, para eventualmente poder relacionar ambos sistemas de transporte y su regulación.

En 1987, Grenson y col. determinaron, genéticamente, que el transporte de GABA está mediado por tres permeasas: la permeasa general de aminoácidos (GAP1), la permeasa específica para prolina (PUT4) y una permeasa específica para GABA (UGA4). Sin embargo, se debe notar que poco después McKelvey y col. (1990), caracterizando bioquímicamente el transporte de GABA en *S. cerevisiae*, sólo

encontraron dos sistemas de transporte con valores de K_T de 12 y 100 μM .

En este trabajo, en cambio, se detectó un solo sistema de transporte de GABA con un K_T de 48 μM . Esto puede deberse a diferentes causas: en primer lugar, la cepa D27 es deficiente en la actividad de GAP; además, las permeasas PUT4 y UGA4 tienen parámetros cinéticos similares (Grenson y col., 1987) y por último, Grenson y col. (1987) determinaron que la incorporación de GABA mediante la permeasa PUT4 es despreciable en células crecidas en medio mínimo con prolina como única fuente de nitrógeno.

Los estudios de especificidad mostraron que la prolina inhibe el sistema de transporte de GABA. Esto sugiere que, por lo menos en parte, el GABA es incorporado a las células a través de la permeasa PUT4.

Por otra parte, el ALA produce una inhibición competitiva sobre el transporte de GABA (K_i 0.5 mM). Esto apoya una vez más la hipótesis de que ambos compuestos comparten una misma permeasa. Como la cepa aquí utilizada es *gap* y la prolina no inhibe el transporte de ALA, la permeasa compartida posiblemente sea la permeasa específica para GABA, UGA4.

Los ensayos de especificidad muestran que el porcentaje de inhibición de GABA sobre el transporte de ALA

es mayor que el de ALA sobre el transporte de GABA. Los parámetros cinéticos obtenidos para ambos sistemas de transporte justifican plenamente estos resultados.

Además, el hecho de que el ALA acumulado intracelularmente regule el transporte de GABA y viceversa, también apoya la hipótesis de una permeasa común para ambos compuestos.

El único hallazgo que parecería contradecir esta propuesta es que el sistema de transporte de ALA es sensible al amonio mientras que, también en este trabajo, se observó que el sistema de transporte de GABA no lo es. Sin embargo, se había demostrado con anterioridad, que los tres sistemas de transporte de GABA son sensibles a la presencia de iones amonio (Grenson y col., 1987). La diferencia entre los resultados encontrados en este trabajo y los de otros autores puede deberse tanto a las distintas cepas empleadas como al uso de métodos diferentes para medir la incorporación de los aminoácidos.

Por lo tanto, es nuestro propósito intentar demostrar concluyentemente si el ALA y el GABA comparten o no una misma permeasa. Para ello, se ha comenzado por caracterizar el sistema de transporte de ALA en la cepa WR3-R3 (*hem1*), deficiente en la actividad de ALA-Sintetasa, a partir de la cual se han de obtener mutantes deficientes en

este transporte. Luego, se ha de determinar si las mutaciones que alteran el transporte de ALA tienen algún efecto sobre el transporte de GABA.

En conclusión, se ha caracterizado exhaustivamente el transporte de ALA a través de membrana, por primera vez en el organismo eucariótico simple *S. cerevisiae*, lo cual ha permitido ampliar nuestro conocimiento acerca del transporte y la metabolización en levaduras de un precursor de la vía biosintética de las porfirinas, el ALA.

Teniendo en cuenta la posibilidad de que dos compuestos estructuralmente relacionados, ALA y GABA, compartan una misma permeasa y las conocidas propiedades neurotóxicas del ALA, la extensión al resto de los organismos eucarióticos de los resultados obtenidos en este trabajo y los que podrán sucederlos, podría contribuir además, al esclarecimiento de la etiopatogenia de las porfirias agudas y al desarrollo de alternativas terapéuticas en base al control del transporte de ALA, fundamentalmente a nivel neuronal.

REFERENCIAS



REFERENCIAS

- André B. (1990) *Mol. Gen. Genet.* 220, 269.
- André B., Hein C., Grenson M. y Janiaux J-C. (1993) *Mol. Gen. Genet.* 237, 17.
- Arrese M., Carvajal E., Robison S., Sambunaris A., Panek A.D. y Mattoon J.R. (1983) *Curr. Genet.* 7, 175.
- Banerjee S., Getz G.S. y Garg M. (1984) *J. Bacteriol.* 158, 94.
- Barnett J.A. (1976) *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry*, 252, 6394.
- Batlle A., Llambías E., Wider E. y Tigier H. (1975) *Int. J. Biochem.* 6, 591.
- Borralho L.M., Panek A.D., Malamud D.R., Sanders H.K. y Mattoon J.R. (1983) *J. Bacteriol.* 156, 141.
- Borralho L.M., Malamud D.R., Panek A.D., Tenan M.N., Oliveira D.E. y Mattoon J.R. (1989) *J. Gen. Microbiol.* 135, 1217.
- Borst-Pauwels G.W.F.H. (1981) *Biochim. Biophys. Acta* 650, 88.
- Bradford M.M. (1976) *Analyt. Biochem.* 72, 248.
- Bray G.A. (1960) *Anal. Biochem.* 1, 279.
- Burnham B.F. y Lascelles J. (1963) *Biochem. J.* 87, 462.
- Bussey H. y Umbarger H.E. (1970a) *J. Bacteriol.* 103, 277.

- Bussey H. y Umbarger H.E. (1970b) *J. Bacteriol.* 103, 286.
- Calderbank J., Keenan M.H.J., Rose A.H. y Holman G.D. (1984) *J. Gen. Microbiol.* 130, 2817.
- Camadro J.M., Chambon H., Jolles J. y Labbe P. (1986) *Eur. J. Biochem.* 156, 579.
- Cartwright C.P., Rose A.H., Calderbank J. y Keenan M.H.J. (1989) en: *The Yeast*, vol. 3, capítulo 2, pág. 5, segunda edición (Rose A.H. y Harrison J.R. editores) Academic Press, Londres y NY.
- Chan P.Y. y Cossins E.A. (1976) *J. Cel. Comp. Physiol.* 17, 311.
- Cheeks C. y Wedden R.P. (1986) *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 181, 596.
- Clark-Walker G.D., Rittenberg B. y Lascelles J. (1967) *J. Bacteriol.* 94, 1648.
- Cooper T.G. (1982) *The molecular biology of the yeast Saccharomyces* pág. 399 (Strathern J.N., Jones E.W. y Broach J.R. editores) Cold Spring Harbor Laboratory.
- Correa García S.R., Bermúdez Moretti M., Cardalda C., Rossetti M.V. y Batlle A. (1993) *Yeast* 9, 165.
- Crabeel M. y Grenson M. (1967) *Eur. J. Biochem.* 14, 197.
- Darte C. y Grenson M. (1975) *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 67, 1028.
- Ebbon J.G. y Tait G.H. (1969) *Biochem. J.* 111, 573.

- Eddy A.A. (1978) en: Current Topics in Membrane Transport (F. Broner F. y Kleinzeller A. editores) vol. 10, pág 279 Academic Press, NY.
- Eddy A.A. (1982) Adv. Microbiol. Physiol. 23, 1.
- Elliot T. (1993) J. Bacteriol. 175, 325.
- Foury F. y Goffeau A. (1975) J. Biol. Chem. 250, 2354.
- Gits J.J. y Grenson M. (1967) Biochim. Biophys. Acta 135, 507.
- Gollub E.G., Liu K.P., Dayan J., Adlerberg M. y Springson D.B. (1977) J. biol. Chem. 252, 2846.
- Granick S. y Sassa S. (1971) en: Metabolic Regulation, vol. 5, pág. 77 (Vogel H. editor) Academic Press, NY.
- Greasham R.L. y Moat A.G. (1973) J. Bacteriol. 115, 975.
- Gregory M.E., Keenan M.H.J. y Rose A.H. (1982) J. Gen. Microbiol. 128, 2557.
- Grenson M., Mousset M., Wiame J-M. y Becuet J. (1966) Biochim. Biophys. Acta 127, 325.
- Grenson M., Hou C. y Crabeel M. (1970) J. Bacteriol. 103, 770.
- Grenson M. y Dubois E. (1982) Eur. J. Biochem. 121, 643.
- Grenson M. (1983a) Eur. J. Biochem. 133, 135.
- Grenson M. (1983b) Eur. J. Biochem. 133, 141.
- Grenson M. Muyldermans F., Broman K. y Vissers S. (1987) Life Sci. Adv. Ser. C6, 35.

- Grenson M. (1990) en: *Molecular Aspects of Transport Proteins*, pág. 219 (Elsevier Sciences Publishers B.V.).
- Guarente L., Lalonde B., Giffold P. y Alani E. (1984) *Cell* 36, 503.
- Gunge N., Sugimura T. y Twasaki M. (1967) *Genetics* 37, 243.
- Halvorson H.O. y Cohen G.N. (1958) *Ann. Inst. Pasteur* 95, 73.
- Helson L., Braverman S. y Mangiardi J. (1993) *Neurochem. Res.* 18 (12), 1255.
- Herrada G., Puppo A. y Rigaud J. (1992) *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 184, 1324.
- Hoffmann W. (1985) *J. biol. Chem.* 260, 11831.
- Horák J. (1986) *Biochim. Biophys. Acta* 864, 223.
- Horák J. y Kotyk A. (1986) *Biochim. Biophys. Acta* 857, 173.
- Jayaraman J., Padmanaban G., Malathi K. y Sarma P.S. (1971) *Biochem. J.* 121, 531.
- Kanner B.I. y Bendahan (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 2550.
- Keenan M.H.J. y Rose A.H. (1979) *FEMS Microbiol. Letters* 6, 133.
- Keenan M.H.J., Rose A.H. y Silverman B.W. (1982) *J. Gen. Microbiol.* 128, 2557.

- Keng T. y Guarente L. (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA
84, 9113.
- Kotliar N., Stella C., Ramos E.H. y Mattoon J. (1994) Cel.
mol. Biol. 40 (6), 833.
- Kotyk A., Ponec M. y Rihová L. (1971) Folia Microbiológica
16, 432.
- Kotyk A., Horák J. y Knotkova A. (1982) Biochim. Biophys.
Acta 698, 243.
- Labbe-Bois R. y Volland C. (1977) Arch. Biochem. Biophys.
179, 565.
- Labbe-Bois R. y Labbe P. (1978) en: Biochemistry and
Genetics of yeast, pág. 97 (Bacilla M., Horecker B. y
Stoppani A.O.M. editores) Academic Press, NY.
- Labbe-Bois R. (1990) J. biol. Chem. 265, 7278.
- Larimore F.S. y Roon R.J. (1978) Biochem. 17, 431.
- Larimore F.S., Kuist I., Korkowsky P.M. y Roon R.J. (1980)
Arch. Biochem. Biophys. 204, 34.
- Lasko P.F. y Brandris M.C. (1981) J. Bacteriol. 166, 763.
- Magna-Schwencke N. y Schwencke J. (1969) Biochim. Biophys.
Acta 173, 313.
- Mahler H.R. y Lin C.C. (1974) Biochim. Biophys. Res. Comm.
61, 963.
- Mahler H.R. y Lin C.C. (1978) J. Bacteriol. 135, 54.

- Malamud D., Borralho L., Panek A.D. y Mattoon J.R. (1979) *J. Bacteriol.* 138 (3), 799.
- Malamud D.R., Padrao G.R.B., Borralho L.M., Arrese M., Panek A.D. Mattoon J.R. (1983) *Braz. J. Med. Biol. Res.* 16, 203.
- Marver H., Tschudy D.P., Perlroth M. y Collins A. (1966) *J. biol. Chem.* 241, 2803.
- Mattoon J.R., Malamud D.R., Brunner A., Braz G., Carvajal E., Lancashire W.E. y Panek A.D. (1978) en: *Biochemistry and Genetics of Yeast*, Pág. 317 (Bacilla M., Horecker B. y Stoppani A.O.M. editores) Academic Press, NY.
- Mauzerall D. y Granick S. (1956) *J. biol. Chem.* 10, 1105.
- Maw G.A. (1963) *J. Gen. Microbiol.* 31, 247.
- McKelvey J., Rai R. y Cooper T.G. (1990) *Yeast* 6, 263.
- Miyake S., Yoshihisa I., Minaka N., Sugimura R. y Oshumi M. (1972) *J. Bacteriol.* 109, 409.
- Nikawa J.I., Nagumo T. y Yamashita S. (1982) *J. Bacteriol.* 150, 441.
- Pietruszko R. y Fowden L. (1961) *Ann. Bot. (Lond.)* 25, 491.
- Ramos E.H., De Bongioani L.C., Claise M.L. y Stoppani A.O.M. (1975) *Biochim. Biophys. Acta* 397, 470.
- Ramos E.H., de Bongioani L.C., Cuesta Csasado M.C. y Stoppani A.O.M. (1977) *Biochim. Biophys. Acta* 467, 220.

- Ramos E.H., de Bongioanni L.C. y Stoppani A.O.M. (1980)
Biochim. Biophys. Acta 599, 214.
- Ramos F., El Guezzar M., Grenson M. y Wiame J-M. (1985)
Eur. J. Biochem. 149, 401.
- Roon R.J., Even H.L., Dunlop P. y Larimore F.L. (1975) J.
Bacteriol. 122, 502.
- Roon R.J., Levy J.S. y Larimore F.S. (1977a) J. biol.
Chem. 252, 3599.
- Roon R.J., Meyer G.M. y Larimore F.S. (1977b) Mol. Gen.
Genet. 158, 185.
- Rytka J. (1975) J. Bacteriol. 121, 562.
- Rytka J., Bilinski T. y Labbe-Bois R. (1984) Biochem. J.
218, 405.
- Sangwan I. y O'Brian M. (1991) Science 251, 1220.
- Santa María J. y Sánchez C. (1977) Anales del Inst. Nac.
de Inv. Agronómicas (Madrid) 5, 63.
- Seaston A., Inkson C. y Eddy A.A. (1973) Biochem. J. 134,
1031.
- Serrano R. (1980) Eur. J. Biochem. 105, 419.
- Serrano R. (1983) FEBS Letters 156,11.
- Serrano R. (1984) Curr. Top. Cell. Reg. 23, 87.
- Sinclair P.R. y Granick S. (1975) Ann. NY. Acad. Sci. 244,
509.

- Surdin Y., Sly W., Sire J., Bordes A.M. y De Robichom-Szulajster (1965) *Biochim. Biophys. Acta* 107, 546.
- van Iwaarden P.R., Driessen A.J.M. y Konings W.N. (1992) *Biochim. Biophys. Acta* 1113, 161.
- Verkamp E., Backman V.M., Bjornsson J.M., Soll D. y Eggestsson G. (1993) *J. Bacteriol.* 175, 1452.
- Verma R.S., Rao T.V.P. y Prasad R. (1984) *Biochim. Biophys. Acta* 778, 298.
- Vissers S., André B., Muyldermans F. y Grenson M. (1989) *Eur. J. Biochem.* 181, 357.
- Whelan W.L., Gocke E. y Manny T.R. (1979) *Genetics* 91, 35.
- Wiame J.M., Grenson M. y Arst H.N. (1984) *Adv. Microbial Physiol.* 25, 1.
- Woods R., Sanders H., Briquet M., Foury F., Drysdale B. y Mattoon J.R. (1975) *J. biol. Chem.* 250, 9090.
- Woodward J.R. y Kornberg H. L. (1980) *Biochem. J.* 192, 659.
- Zagorec M. y Labbe-Bois R. (1986) *J. biol. Chem.* 261, 2506.
- Zagorec M., Buhler J.M., Treich I., Keng T., Guarente L. y Labbe-Bois R. (1988) *J. biol. Chem.* 263, 9718.

