

Tesis de Posgrado

Transporte de L-Leucina en *Saccharomyces cerevisiae* transformada por el GEN RAS2val19

Saenz, Daniel Alberto

1995

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:

Saenz, Daniel Alberto. (1995). Transporte de L-Leucina en *Saccharomyces cerevisiae* transformada por el GEN RAS2val19. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2701_Saenz.pdf

Cita tipo Chicago:

Saenz, Daniel Alberto. "Transporte de L-Leucina en *Saccharomyces cerevisiae* transformada por el GEN RAS2val19". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1995. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2701_Saenz.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

TRANSPORTE DE L-LEUCINA EN *Saccharomyces cerevisiae*
TRANSFORMADA POR EL GEN *RAS2^{val19}*.

DANIEL ALBERTO SAENZ

DIRECTOR DE TESIS: Dra EUGENIA H. RAMOS

DEPARTAMENTO DE BIOQUIMICA,
FACULTAD DE MEDICINA
UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Tesis presentada para optar al título de:

DOCTOR DE LA UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

1995

Tesis

h
h 2

AGRADECIMIENTOS

Son muchas las personas que en distintas formas posibilitaron la realización de este trabajo. A todas ellas les brindo un cálido agradecimiento.

A la Dra Eugenia H. Ramos, quien me dio la oportunidad de iniciarme en la investigación científica, brindándome siempre su confianza, dedicación y constancia en la dirección de este trabajo.

A la Dra Ana María Stella, por preocupación y tiempo dedicado como consejera de estudios.

Al Dr James R. Mattoon, por haberme cedido las cepas de *S. cerevisiae* y por la gran hospitalidad con que me recibió en el centro de investigación que el dirige.

Al Dr Carlos A. Stella, con quien comencé el trabajo de laboratorio y me brindó siempre su experiencia y conocimiento.

A Mónica quien colaboró en todas las etapas de este trabajo aportando además alegría y buen humor aún en los momentos más difíciles.

A Susana y Mariana por su desinteresada colaboración y los gratos momentos compartidos, que hicieron que todo resultara más fácil y placentero.

A Adrián por su asistencia en el laboratorio y colaboración en la toma de fotografías.

A la Sra Irene Blasón de López, por su disposición y eficiencia en la preparación del material de laboratorio.

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.

A todos aquellos que durante estos años estuvieron a mi lado brindándome su apoyo, tanto en el plano científico como en el personal.

a mi familia

ABREVIATURAS

AMPc	3'-5' Monofosfato de adenosina cíclico.
A _{570nm}	Absorbancia a 570 nm.
Tris-HCl	Tris (hidroximetil) aminometano. HCl.
EDTA	Acido etilendiaminotetracético.
SDS	Dodecilsulfato de sodio.
AcoK	Acetato de potasio.
AcoH	Acido acético.
FHK	Ftalato ácido de potasio.
pH _i	pH interno.
c _i	Concentración interna.
c _e	Concentración externa.
FDA	Diacetato de fluoresceína.
I ₄₉₀	Intensidad a 490 nm.
J _{máx}	Velocidad máxima de transporte para el sistema.
K _T	Concentración de sustrato para alcanzar la mitad de la velocidad máxima del sistema transportador.
g. ps	gramos de peso seco de células.
v _i	Velocidad inicial de entrada.
GAP1	Permeasa general de aminoácidos.

INDICE GENERAL

INDICE GENERAL

	página
INTRODUCCION	
CAPITULO 1.	
1.1. Levaduras como modelo experimental de células eucariotas.	1
1.1.1. Características de las células de levaduras.	1
1.1.2. Ciclo celular de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .	2
1.2. Procesos de transporte.	7
1.2.1. Sistemas de transporte de aminoácidos	8
1.2.2. Sistemas transportadores de L-leucina.	13
1.3. Vía RAS/PKA en <i>S. cerevisiae</i> .	15
1.3.1. Proteínas RAS	15
1.3.2. Modificaciones post-transcripcionales de las proteínas RAS en <i>S. cerevisiae</i> .	21
1.3.3. Proteínas que participan en la regulación de las proteínas RAS.	22
1.3.4. Proteínas que actúan "downstream" a las proteínas RAS.	24
1.3.5. La vía RAS/PKA como transductor de señales externas.	27
OBJETIVOS	28
MATERIALES Y METODOS.	
CAPITULO 3.	
3.1. Cepas de levadura empleadas.	32
3.2. Medios de cultivo.	33
3.3. Mantenimiento de las condiciones de esterilidad.	34
3.4. Mantenimiento de las cepas de levadura.	34
3.5. Condiciones de crecimiento.	35

	página
3.6. Curvas de crecimiento.	36
3.7. Aislamiento de los plásmidos.	38
3.8. Transformación de las células de levadura.	39
3.9. Control celular.	39
3.9.1. Verificación de la presencia de los plásmidos.	39
3.9.2. Determinación de mutantes <i>gap1</i> .	40
3.9.3. Tinción de carbohidratos.	40
3.10. Suspensión celular de trabajo.	40
3.11. Ensayo de entrada e incorporación de L- ¹⁴ C leucina.	41
3.12. Determinación de parámetros cinéticos.	42
3.13. Determinación el efecto de L-aminoácidos sobre la entrada de L-leucina.	42
3.14. Determinación de la concentración intracelular de protones.	43
3.14.1. Método de distribución de ácido ¹⁴ C (carboxi) benzoico.	43
3.14.2. Método espectrofluorométrico.	44
3.14. Determinación de la radiactividad de las muestras.	45
3.16. Diseño experimental y expresión de resultados.	45
3.17. Reactivos empleados.	46

RESULTADOS

CAPITULO 4. ESTUDIO DEL PROCESO DE TRANSPORTE DE L-LEUCINA EN CEPAS CON MUTACIONES NUCLEARES EN EL GEN RAS2.

4.1. Crecimiento celular en diferentes medios de cultivo.	47
4.2. Control celular.	48
4.3. Entrada e incorporación de L- ¹⁴ C leucina.	48
4.4. Determinación de la concentración intracelular de protones.	54
4.5. Parámetros cinéticos de los sistemas transportadores.	55
4.6. Efecto de L-aminoácidos sobre la entrada de L- ¹⁴ C leucina.	60
4.7. Incorporación de L- ¹⁴ C citrulina.	62

CAPITULO 5. ESTUDIO DEL PROCESO DE TRANSPORTE DE L-LEUCINA EN LAS CEPAS MMY2 Y MMY2/H3.

5.1. Entrada e incorporación de L- ¹⁴ C leucina.	65
5.2. Determinación de la concentración intracelular de protones.	66
5.3. Parámetros cinéticos de los sistemas transportadores.	70
5.4. Efecto de L-aminoácidos sobre la entrada de L- ¹⁴ C leucina.	76
5.5. Incorporación de L- ¹⁴ C citrulina.	77

CAPITULO 6. ESTUDIO DEL PROCESO DE TRANSPORTE DE L-LEUCINA EN CELULAS TRANSFORMADAS MMY2 YCp50 Y MMY2 YCp50*RAS2val19*.

6.1. Crecimiento celular en diferentes medios de cultivo.	81
6.2. Control celular.	82
6.3. Entrada e incorporación de L- ¹⁴ C leucina.	82
6.4. Determinación de la concentración intracelular de protones	89
6.5. Parámetros cinéticos de los sistemas transportadores.	90
6.6. Efecto de L-aminoácidos sobre la entrada de L- ¹⁴ C leucina.	91
6.7. Incorporación de L- ¹⁴ C citrulina.	98

CAPITULO 7. ESTUDIO DEL PROCESO DE TRANSPORTE DE L-LEUCINA EN CELULAS TRANSFORMADAS MMY2/H3 YCp50 Y MMY2/H3 YCp50*RAS2val19*.

7.1. Obtención de las cepas MMY2/H3 transformadas.	103
7.2. Control celular.	103
7.3. Crecimiento celular en diferentes medios de cultivo.	105
7.4. Entrada e incorporación de L- ¹⁴ C leucina.	106

	página
7.5. Determinación de la concentración intracelular de protones.	112
7.6. Parámetros cinéticos de los sistemas transportadores.	113
7.7. Efecto de L-aminoácidos sobre la entrada de L- ¹⁴ C leucina.	116
7.8. Incorporación de L- ¹⁴ C citrulina.	116
DISCUSION.	119
CONCLUSIONES.	125
REFERENCIAS.	128

INTRODUCCION

CAPITULO 1

INTRODUCCION

	página
1.1. Levaduras como modelo experimental de células eucariotas.	1
1.1.1. características de las células de levaduras.	1
1.1.2. Ciclo celular de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .	2
1.2. Procesos de transporte.	7
1.2.1. Sistemas de transporte de aminoácidos	8
1.2.2. Sistemas transportadores de L-leucina.	13
1.3. Vía RAS/PKA en <i>S. cerevisiae</i> .	15
1.3.1. Proteínas RAS	15
1.3.2. Modificaciones post-transcripcionales de las proteínas RAS en <i>S. cerevisiae</i> .	21
3.3. Proteínas que participan en la regulación de las proteínas RAS.	22
3.4. Proteínas que actúan "downstream" a las proteínas RAS.	24
3.5. La vía RAS/PKA como transductor de señales externas.	27

1.1. Levaduras como modelo experimental de células eucariotas.

Las levaduras y en particular las del género *Saccharomyces* se producen industrialmente. Su disponibilidad, fácil y rápido crecimiento en diversos medios de cultivo y condiciones de aireación, han permitido una fuente ideal de biomasa para investigar el comportamiento celular.

En los últimos años se ha manifestado un masivo incremento en el uso de células de levadura como modelo de organismo eucariota, en el cual estudiar procesos celulares básicos. El auge de la utilización de este tipo de células en el estudio de la biología celular, ha sido impulsado por el notable incremento del conocimiento del genoma de levaduras, y en mayor medida, debido a que dicho genoma puede ser fácilmente transformado mediante técnicas de ingeniería genética.

1.1.1. Características de las células de levadura.

La habilidad de las levaduras para utilizar varias fuentes de carbono, está altamente regulada. La expresión de los genes que codifican para las proteínas involucradas en la utilización de ciertas fuentes de carbono, es inducida por las mismas.

La actividad de las enzimas requeridas para la utilización de una fuente de carbono está usualmente disminuía, cuando se dispone de una mejor fuente.

Las células de levadura utilizan una variedad de compuestos como fuente de carbono y para la producción de energía celular tales como glucosa, fructosa, galactosa, manosa, di y trisacaridos; además, pueden utilizar varias fuentes de carbono no fermentables como etanol, lactato y glicerol (Johnston y Carlson, 1992).

Las células de levadura son capaces de utilizar una diversidad de compuestos nitrogenados, que se encuentran en el entorno. Estas sustancias conteniendo nitrógeno pueden ser utilizadas como una fuente general de nitrógeno o como intermediarios en la síntesis de macromoléculas.

El metabolismo del nitrógeno en *S. cerevisiae* y la degradación de compuestos orgánicos nitrogenados en ésta y otras levaduras, ya han sido descritas (Wiame y Grenson, 1985; Horak, 1986). En la figura 1.1 se presenta el destino de los compuestos nitrogenados usados como fuente de nitrógeno, para la biosíntesis en *S. cerevisiae*. En este organismo muchas vías de degradación conducen al glutamato o NH_4^+ o a ambos; el último donador de nitrógeno para la síntesis puede ser L-glutamato o L-glutamina.

1.1.2. Ciclo celular de *Saccharomyces cerevisiae*.

Saccharomyces cerevisiae puede crecer vegetativamente como haploide o diploide; la mayoría de las cepas empleadas en los laboratorios son haploides mientras que muchas cepas industriales son poliploides o aneuploides. Como se muestra en la Figura 1.2, en el ciclo sexual normal, una célula diploide resulta de la fusión de dos células haploides de tipo sexual opuesto (α o a). Toda la información genética de ambas cepas parentales, cromosomal o citoplasmática (no cromosomal), contribuye al cigoto; esta célula diploide, heterocigota con respecto al tipo sexual (α/a), ha perdido la capacidad de acoplarse, no libera factores sexuales ni responde a ellos. Bajo ciertas condiciones de ayuno (ej. sin fuente de nitrógeno), sufre meiosis, formándose un asca que normalmente contiene cuatro esporas haploides, dos de cada tipo sexual.

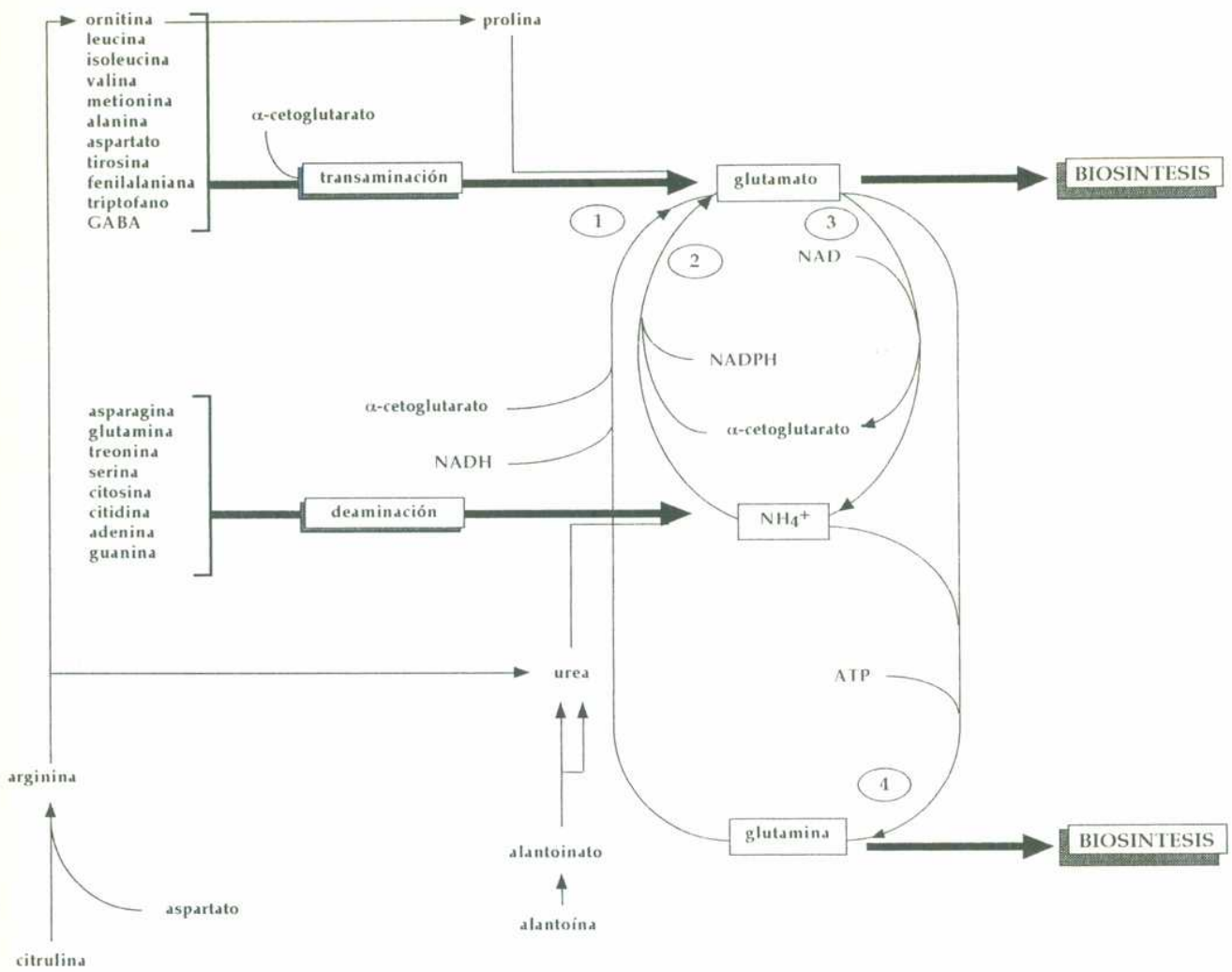


Figura 1.1. Esquema general de las principales reacciones involucradas en la utilización de nitrógeno en *S. cerevisiae* crecida con diferentes compuestos nitrogenados. 1, glutamato sintetasa; 2, glutamato deshidrogenasa (anabólica); 3, glutamato deshidrogenasa (catabólica); 4, glutamina sintetasa.

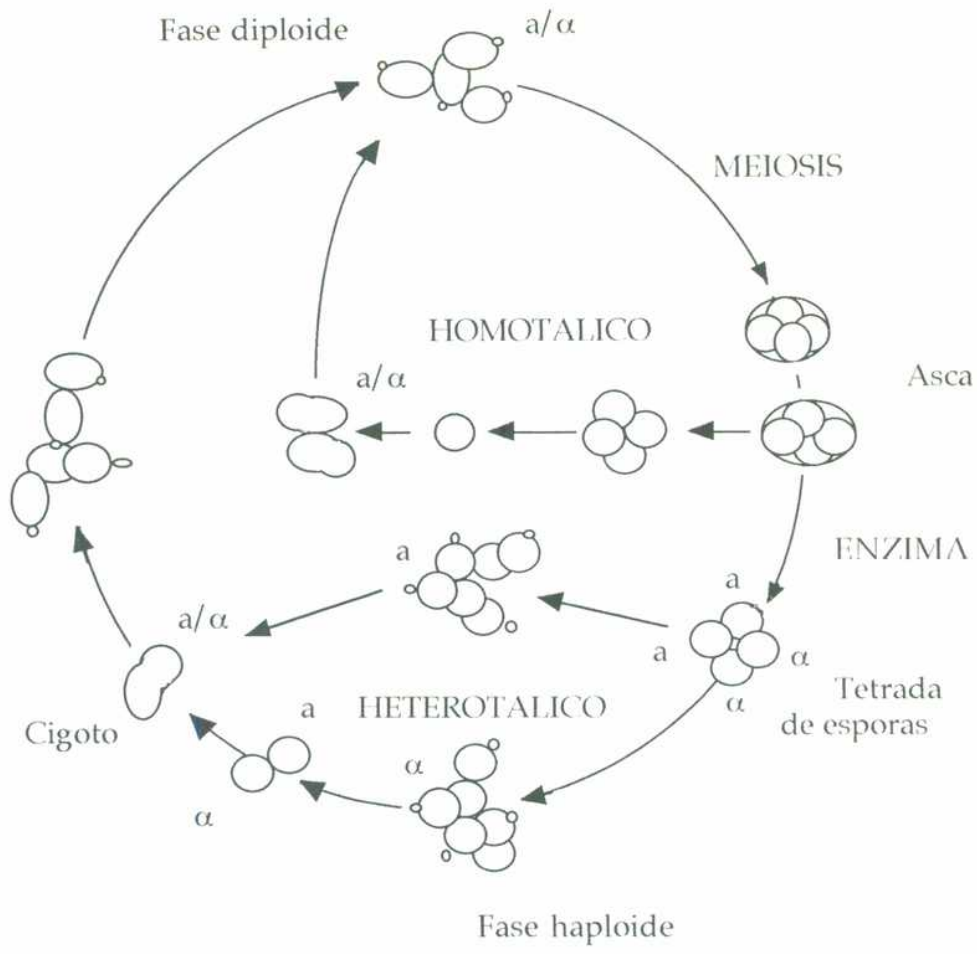


Figura 1.2. Ciclo de vida sexual de la levadura.

La transferencia de las esporas a un medio con nutrientes resulta en germinación y rápida fusión dentro del asca, formándose dos células diploides α/a .

Frecuentemente, las esporas germinativas de cepas heterotálicas escapan del asca dando origen a colonias de células haploides con crecimiento vegetativo, cuando son mantenidas aisladas de células de tipo sexual opuesto. El crecimiento vegetativo se caracteriza por gemación y mitosis (Hartwell, 1974).

El ciclo de división celular se representa en la Figura 1.3. En medio nutritivo, las células de *S. cerevisiae* crecen por gemación, la producción de una gema indica que la célula ha entrado en un nuevo ciclo de división.

Durante el ciclo celular, hay un incremento en los componentes celulares, incluyendo duplicación del material genético. El aumento de la masa y del volumen celulares, es casi exclusivamente debido al crecimiento de la gema. La segregación de los cromosomas ocurre mitóticamente dentro de la membrana nuclear intacta.

Después de completar la citoquinesis y la formación del septo, se libera una célula hija con todos los componentes celulares y funciones necesarias para el crecimiento vegetativo (Kreutzfeldt and Witt, 1991). Mediante microscopía electrónica, se han determinado los cambios morfológicos que ocurren durante la división celular.

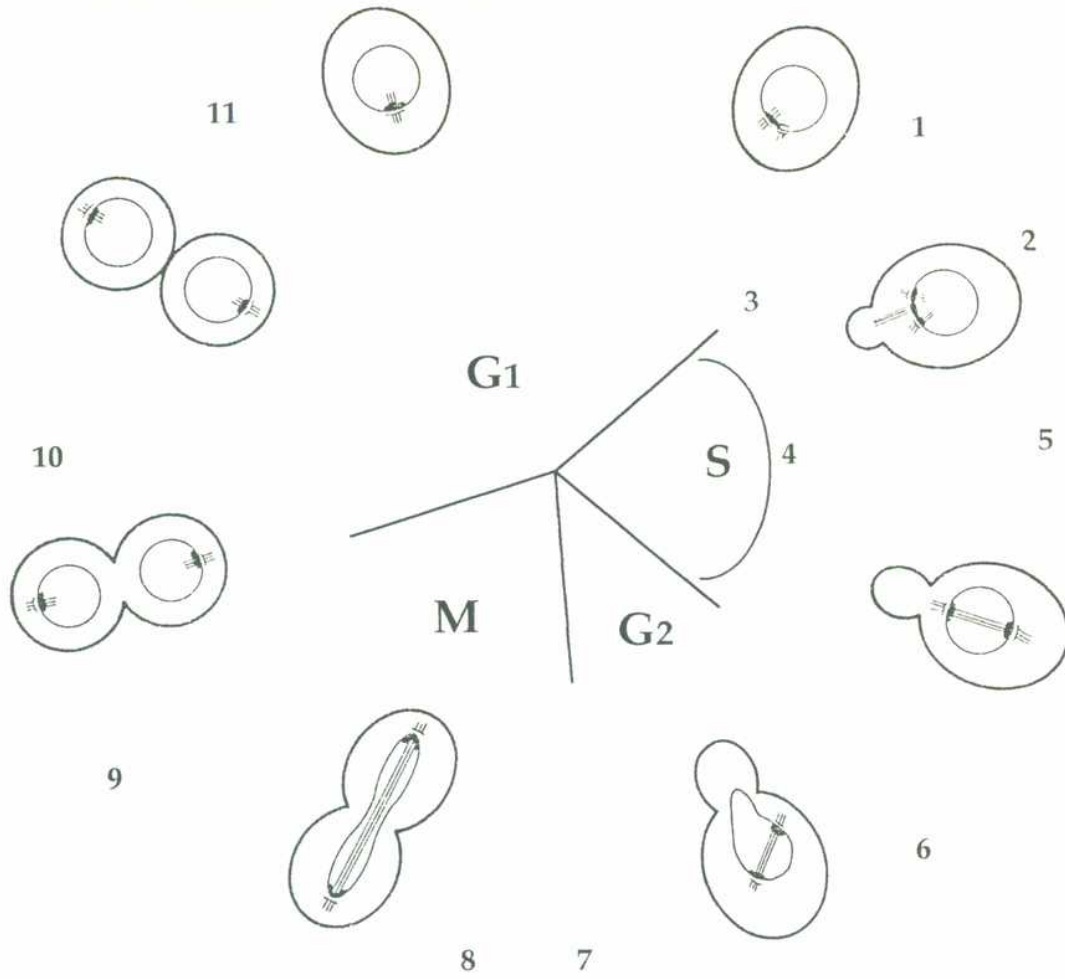


Figura 1.3. Ciclo de división celular en *S. cerevisiae*.

1, Duplicación de la placa; 2, formación de la gema; 3, iniciación de la síntesis de DNA; 4, síntesis de DNA; 5, separación de la placa; 6, migración nuclear; 7, estadio medio de la migración nuclear; 8, elongación del huso; 9, última etapa de división nuclear; 10, citocinesis; 11, separación celular.

1.2. Procesos de transporte.

Así como en la mayoría de los organismos eucariotas superiores, la membrana plasmática de *S. cerevisiae* es selectivamente permeable a diferentes sustancias, tales como aminoácidos, carbohidratos, purinas y pirimidinas, etc. El proceso de transporte de los diferentes nutrientes exógenos, al interior celular, constituye el primer paso para su utilización posterior.

Los procesos involucrados en el transporte de solutos a través de las membranas biológicas pueden ser básicamente: difusión simple, difusión facilitada y transporte activo.

La difusión simple es el paso del soluto a través de la membrana, sin involucrar una proteína de transporte; este proceso está gobernado por la ley de acción de masas, no es saturable con respecto a la concentración del sustrato y no es afectado ni por la temperatura ni por inhibidores metabólicos.

Hay dos tipos de sistemas que involucran una proteína de transporte, por lo tanto ambos son procesos saturables con respecto a la concentración del sustrato, dependientes de la temperatura, inhibidos por compuestos estructuralmente análogos al sustrato a transportar y afectados por mutaciones apropiadas. El primero utiliza un gradiente de concentración y es denominado difusión facilitada o no concentrativa; como en el caso anterior el sustrato no es concentrado en el interior de la célula. El otro sistema requiere energía metabólica que le permite acumular varias veces el soluto transportado, con respecto a su concentración en el medio externo y es denominado transporte activo; una característica distintiva de este último sistema es su sensibilidad a inhibidores del metabolismo energético celular (Cooper, 1982; Cartwright y col., 1989).

Un número importante de transportadores han sido detectados por aislamiento de mutantes resistentes a análogos tóxicos, en las cuales está

selectivamente inactivada una permeasa sin alterarse la actividad de las enzimas involucradas en la metabolización del soluto a transportar. En las investigaciones bioquímicas de los sistemas transportadores es importante el estudio del efecto de inhibidores competitivos, el análisis cinético y la regulación de la actividad, que son utilizados como criterios para distinguir un sistema transportador de otro (Grenson, 1992).

1.2.1 Sistemas de transporte de aminoácidos.

En las células de levadura, los sistemas de transporte de aminoácidos exhiben un compromiso entre los sistemas bacterianos, de especificidad restringida para aminoácidos individuales o un pequeño grupo de éstos estructuralmente relacionados, y los sistemas de células de mamíferos, de amplia especificidad (Cooper, 1982; Horak, 1986).

La mayoría de los aminoácidos son acumulados en el interior de las células de levadura contra un gradiente de concentración. Cuando los aminoácidos son utilizados como una fuente general de nitrógeno, su concentración es crucial debido a que la mayoría de las enzimas que catalizan la primera etapa de la vía catabólica, tienen por lo general baja afinidad por su sustrato (Grenson, 1992).

En relación con sus condiciones de vida, las células de levadura *S. cerevisiae* han desarrollado un gran número de sistemas de transporte, los cuales incorporan compuestos nitrogenados presentes en el medio extracelular (Horak, 1986).

Es sorpresivamente alto el número de sistemas transportadores en la membrana plasmática de *S. cerevisiae*; en muchos casos un sustrato es transportado por varias permeasas con diferencias en las afinidades, especificidades, capacidades y sus regulaciones.

Un número importante de aminoácidos es transportado por dos permeasas, la permeasa general de aminoácidos (GAP1) y otra permeasa específica; otros aminoácidos como leucina (Ramos y col., 1977; Stoppani y Ramos, 1978), metionina (Gits and Grenson, 1967), histidina (Crabell and Grenson, 1970), glutamato (Darte and Grenson, 1975), lisina (Grenson, 1966) y γ -aminobutírico (Grenson y col., 1987) son transportados por dos o tres sistemas de transporte con muy diferentes valores de constante de afinidad (K_T) y capacidad ($J_{m\acute{a}x}$).

Los sistemas de transporte de alta afinidad permiten a las células obtener aminoácidos del medio de cultivo, a pesar de encontrarse a muy bajas concentraciones externas. Con tal diversidad de permeasas, las células de levadura pueden incorporar aminoácidos a muy diferentes velocidades sobre un vasto rango de concentraciones externas. Además, la multiplicidad y diversidad de transportadores de aminoácidos le permiten a las células de levadura acumular aminoácidos para biosíntesis y catabolismo bajo una gran variedad de condiciones. La regulación de la actividad de estos sistemas de transporte es tal que sólo algunos están presentes permanentemente, sistemas constitutivos. El resto de los sistemas se denominan adaptativos o inducibles (Grenson, 1992). Ejemplos de sistemas adaptativos son la permeasa general de aminoácidos (GAP1) y la permeasa de prolina, PUT4 (Horak, 1986) y de sistemas inducibles son las permeasa específicas de L-serina (Horák, 1986) y de γ -aminobutírico, UGA4 (Grenson, 1992).

Surdin y col. (1965) encontraron que la acumulación de un número importante de L-aminoácidos era dependiente de la expresión de un solo sistema de transporte, aislando mutantes pleitrópicas en el transporte de aminoácidos denominadas *nap1*.

Posteriormente, se demostró la existencia de transportadores específicos para arginina (Grenson y col., 1966), lisina (Grenson, 1966) y metionina (Gits y Grenson, 1967), resultados que no estaban de acuerdo con un sistema general de transporte de aminoácidos (Grenson y col., 1966).

Se comprobó que la mutación *aap1* es alélica a la *apf1*, la cual produce una fuerte disminución en la actividad de todas las permeasas de aminoácidos testeadas. Este efecto pleiotrópico indicó que el producto del gen *APF1* era un factor común necesario para la actividad óptima de todas las permeasas de aminoácidos (Wiame y Grenson, 1985).

Grenson y col. (1970) presentaron una mutante con evidencias cinéticas y genéticas de la presencia de la permeasa general de aminoácidos, GAP1 en *S. cerevisiae*. Encontraron que mutantes defectivas en la permeasa de arginina resistentes al análogo tóxico de L-arginina, L-canavanina, seleccionadas en medio mínimo amonio, recobraban su sensibilidad a la L-canavanina cuando eran crecidas en medios de cultivo con una fuente pobre de nitrógeno como L-prolina.

Teniendo en cuenta estos resultados, aislaron una mutante can^R a partir de una cepa deficiente en la permeasa específica de arginina por crecimiento en medio mínimo prolina suplementado con L-canavanina; a esta mutación se la denominó *gap1*. Esta mutante presentaba una disminución en el transporte de aminoácidos básicos y neutros cuando crecía con prolina en vez de iones amonio como fuente de nitrógeno. Grenson y col. (1970) concluyeron que en *S. cerevisiae* había una permeasa general de aminoácidos constitutiva, cuya actividad era regulada por iones amonio. La mutación *gap1* no era alélica a la mutación *aap1* ya que presentaban diferentes fenotipos.

Esta permeasa tiene más de veinte sustratos naturales, más de la mitad pueden ser usados como fuente de nitrógeno mientras que otros no pueden suministrar iones amonio, glutamato o glutamina. Los sustratos transportados por la GAP1 incluyen a todos los L-aminoácidos constitutivos de proteínas, por ejemplo aminoácidos básicos y neutros (Grenson y col., 1970), ácidos como glutamato y aspartato (Darte y Grenson, 1975), glutamina y asparagina (Grenson y Dubois, 1982) e inclusive L-prolina (Lasko y Brandriss, 1981); los isómeros D de un número de aminoácidos, que son tóxicos para la célula de levadura, son también sustratos de la GAP1 y han sido usados como agentes selectivos para obtener mutantes *gap1* (Rytka, 1975). También, los L-aminoácidos no

proteicos son transportados por esta permeasa tal como citrulina, ornitina, ácido α -aminoadípico y un número de análogos tóxicos como L-canavanina, tiosina, etionina (Grenson y col., 1970), N- δ -cloro-acetil-L-ornitina y ácido monohidroxámico (Grenson y Dubois, 1982).

La mayoría de las permeasas de aminoácidos estudiadas en *S.cerevisiae* son inhibidas después de precargar las células con su sustrato; este mecanismo es denominado inhibición por "feedback" (Wiame y Grenson, 1985). Un efecto similar se observa por acción de la cicloheximida, ya que no provoca un efecto de inhibición sobre la síntesis de las permeasas, sino que provoca un aumento en el reservorio endógeno de aminoácidos (Grenson y col., 1968). El mismo tipo de inhibición fue encontrado en el caso de las permeasas de uracilo, citosina y uridina (Grenson, 1969).

Con la adición de iones amonio a cepas silvestres crecidas en medio con prolina, la permeasa general de aminoácidos es progresiva y completamente inactivada; simultáneamente con la disminución de su actividad, la síntesis de la permeasa es detenida por represión. Este proceso se lleva a cabo por dos mecanismos regulatorios diferentes, ya que pueden ser perdidos separadamente por mutaciones (Grenson, 1983a). Basado en el comportamiento de simples y dobles mutantes afectadas en este proceso regulatorio, Grenson (1983b) propuso el modelo de la Figura 1. 4.

Mutaciones que afectan los genes *MUT2* y *MUT4* o *PGR* perdieron el mecanismo de inactivación de la permeasa general de aminoácidos, mientras que mutantes *gdh-CR* y *glu^{ts}* perdieron la represión de la síntesis de la permeasa en presencia de iones amonio. Cepas doble mutantes (*mut2* o *mut4* o *pgr* y *gdh-CR* o *glu^{ts}*) poseen actividad de GAP1 normal, crecidas en medio mínimo amonio. Además, las permeasas de prolina *PUT4* y de ureidosuccinato *UEP1/DAL5* presentan actividad normal en este tipo de mutantes. El efecto de la mutación *pgr* está estrictamente limitado a la actividad de la permeasa general de aminoácidos.

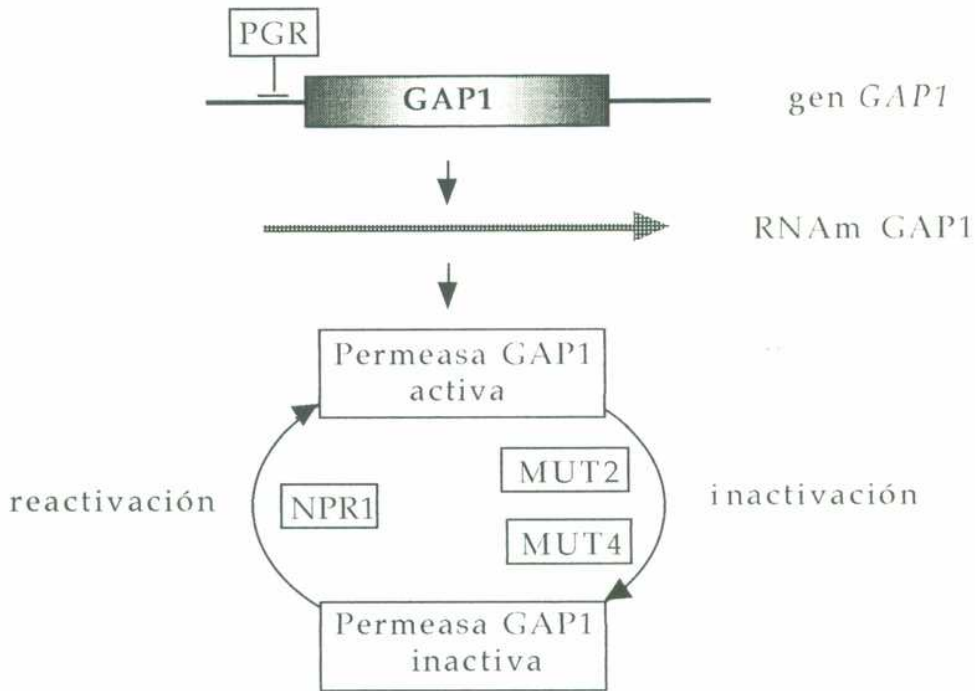


Figura 1.4. Esquema de la regulación de la síntesis de la permeasa general de aminoácidos en *S. cerevisiae*.

En la parte superior del esquema se representa la represión de la síntesis de la permeasa, mientras que en la parte inferior se representa la inactivación y reactivación.

Grenson (1983a) concluyó que la región PGR determina un sitio receptor para el control negativo mediado por los productos de los genes *MUT2* y *MUT4*. Mutaciones en estos dos genes afectan el mecanismo regulatorio, por el cual es inactivada la GAP1, cuando los iones amonio son adicionados al medio de cultivo y por lo tanto el sitio PGR puede ser traducido.

Igualmente observó que la GAP1 es rápidamente reactivada cuando los iones amonio son removidos del medio de cultivo, antes de desarrollarse el proceso de represión. Esta activación parece depender del producto del gen *NPR1* (Grenson, 1983a).

Mutaciones en el gen *NPR1* tienen un efecto pleitrópico sobre varias permeasas amonio sensibles; esta mutación inactiva la GAP1, disminuye la actividad de la permeasa de prolina en un 50% y en un 80% la permeasa de ureisiccinato. Además, las dos permeasas de iones amonio son también inactivadas parcialmente en mutantes *npr1* (Grenson, 1983b). Una segunda razón para considerar que NPR1 es una proteína regulatoria, es que tiene características de una proteína quinasa (Vandenbol y col., 1990). La quinasa NPR1 podría fosforilar directamente las permeasas o más probablemente suprimir las propiedades inactivantes de uno o de ambos productos de los genes *MUT2* y *MUT4* (Grenson, 1992).

Otras permeasa no son afectadas cuando las células crecen con iones amonio como fuente de nitrógeno, tal como las permeasas específicas de arginina (Grenson y col., 1966), lisina (Grenson, 1966), metionina (Gits y Grenson, 1967) e histidina (Crabell y Grenson, 1970).

1.2.2. Sistemas transportadores de L-leucina.

Ramos y col. (1977; 1979 y 1980) demostraron la existencia de dos sistemas específicos en el transporte de L-leucina en *S. cerevisiae*. Ambos sistemas de transporte, caracterizados cinéticamente, se denominaron S1 y S2. El sistema S1 es de alta afinidad y baja velocidad, opera preferentemente a baja concentración de L-leucina externa, y el sistema S2 es de baja afinidad y alta velocidad opera preferentemente a altas concentraciones de L-leucina externa.

El estudio de las propiedades de los sistemas de transporte demostró que el proceso de entrada involucra: 1, el reconocimiento específico de la molécula a transportar por un componente de la barrera de permeabilidad; 2, la translocación del aminoácido a través de esa barrera; 3, el acople a un sistema generador de energía libre de Gibbs y 4, la liberación del aminoácido al medio intracelular, siendo dicho proceso unidireccional (Wainer y col., 1988).

El estudio en mutantes ρ^- , deficientes respiratorias, permitió distinguir el aporte energético de procesos metabólicos mitocondriales y citoplasmáticos (Ramos y col., 1975 y 1983).

Kotliar y Ramos (1983) demostraron que protoplastos provenientes de células de levaduras también poseen dos sistemas de transporte, la cinética de entrada aparentemente no estaba afectada por la pérdida de la pared celular. Esto sugirió que un componente perisplasmático no está involucrado en el proceso de transporte de L-leucina y que las entidades relacionadas con la afinidad de los sistemas estaban localizadas en la membrana plasmática.

El estudio del transporte de L-leucina en cepas silvestres, cultivadas en medios con distintas fuentes de nitrógeno, y en mutantes *gap1*, permitió conocer la participación de los sistemas S1, S2 y la GAP1 (Kotliar y col., 1994), su regulación por iones amonio (Kotliar y col., 1990) y discriminar las actividades de los tres sistemas, en relación con la concentración intracelular de protones y el ApH a través de la barrera de permeabilidad (Stella y col., 1992).

Los sistemas S1 y S2 son de especificidad restringida, siendo el sistema de mayor afinidad el de mayor especificidad. Tullin y col. (1991) describieron la identificación de un sistema de alta afinidad responsable del transporte de L-isoleucina, L-valina y L-leucina; resultados similares fueron obtenidos en mutantes *gap1* (Chianelli, comunicación personal).

Ramos y col. (1977) observaron un aumento en la velocidad de transporte de L-leucina, en levaduras preincubadas con altas concentraciones externas de AMPc. Resultados del efecto del AMPc sobre

el transporte de aminoácidos, fueron también presentados en levaduras *Schizosaccharomyces pombe* (Foury y Goffeau, 1975; Sychrová y col., 1989).

1.3. Vía RAS/PKA en *S. cerevisiae*.

La vía RAS/PKA, como actualmente se conoce, se representa en la Figura 1.5. Las proteínas están nombradas por los genes que las codifican.

1.3.1. Proteínas RAS

Los genes *RAS1* y *RAS2* de *S. cerevisiae* han sido identificados por su gran homología con los genes *ras* de mamíferos y por hibridizar con sondas de *ras* viral (DeFeo-Jones y col., 1983; Powers y col., 1984; Gretchen y col., 1985). Ambos genes están localizados en los cromosomas XV y XIV, respectivamente. Los productos de estos genes son proteínas de 309 y 322 aminoácidos, con 40 y 41 KDa respectivamente (Dhar y col., 1984). El mayor tamaño de las proteínas RAS de *S. cerevisiae*, comparadas con las proteínas *ras* de mamíferos, se debe a la presencia de 7 aminoácidos extras en la región amino-terminal y la presencia de una larga región carboxi-terminal de la proteína. La región entre los residuos de aminoácidos 10 a 90 está altamente conservada, presentando cerca de un 90% de homología, entre la proteína de levadura la de mamíferos, así como entre las dos proteínas de levadura. Los siguientes 80 aminoácidos también presentan significativa homología, cerca del 50%, cuando se comparan las proteínas de levadura con las de mamíferos, mientras que las dos proteínas RAS de levadura son muy homólogas en esta región.

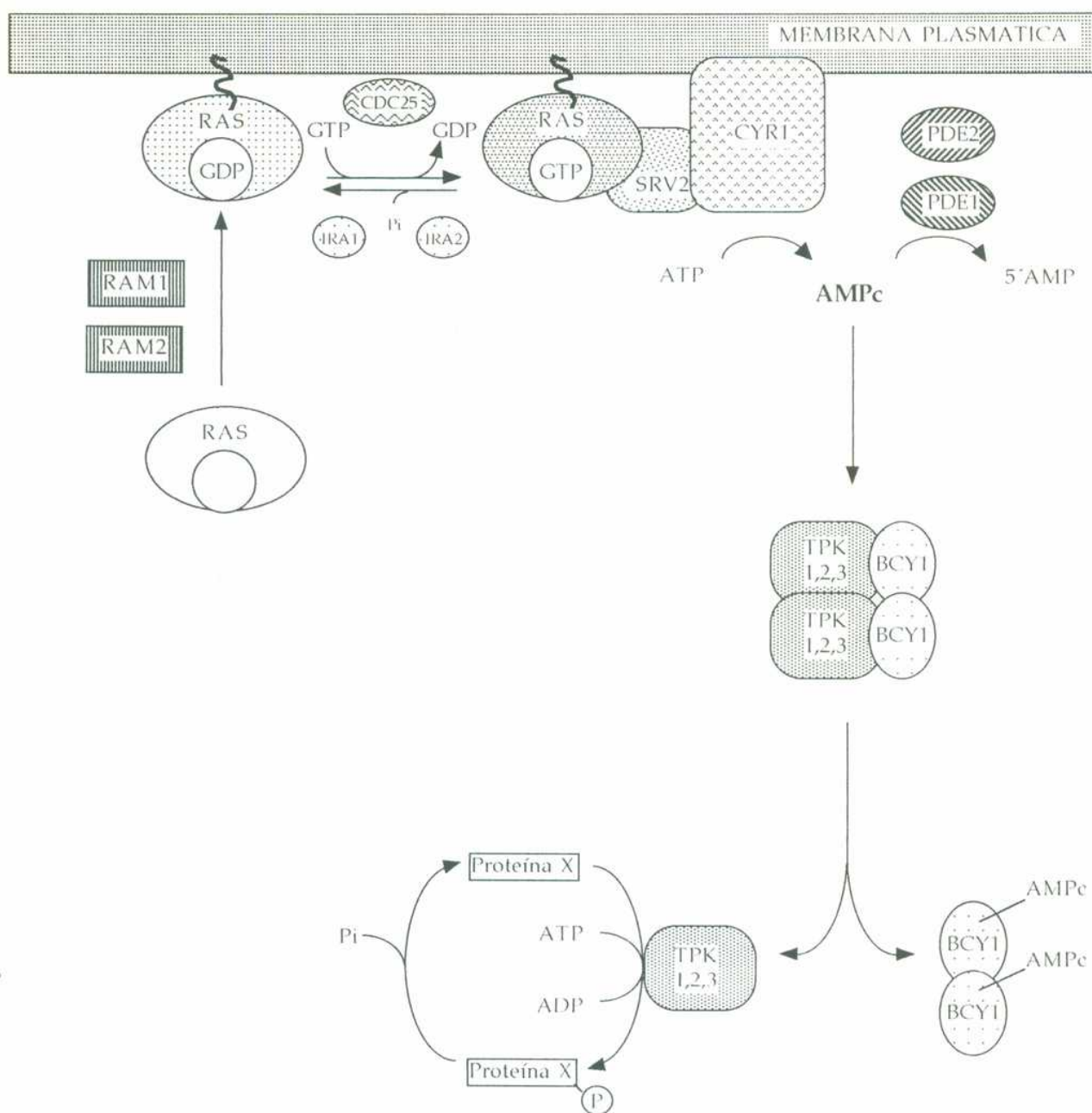


Figura 1.5. Vía RAS/PKA en *Saccharomyces cerevisiae*.

La homología disminuye a partir del residuo 160 y la mayoría de los restos aminoácídicos de la región carboxi-terminal son diferentes entre las proteínas de mamíferos y las de levadura así como entre RAS1 y RAS2 de levadura.

Por otra parte, ambas proteínas RAS de *S. cerevisiae* tienen una estructura común con las de otros organismos, como se muestra en la Figura 1.6.

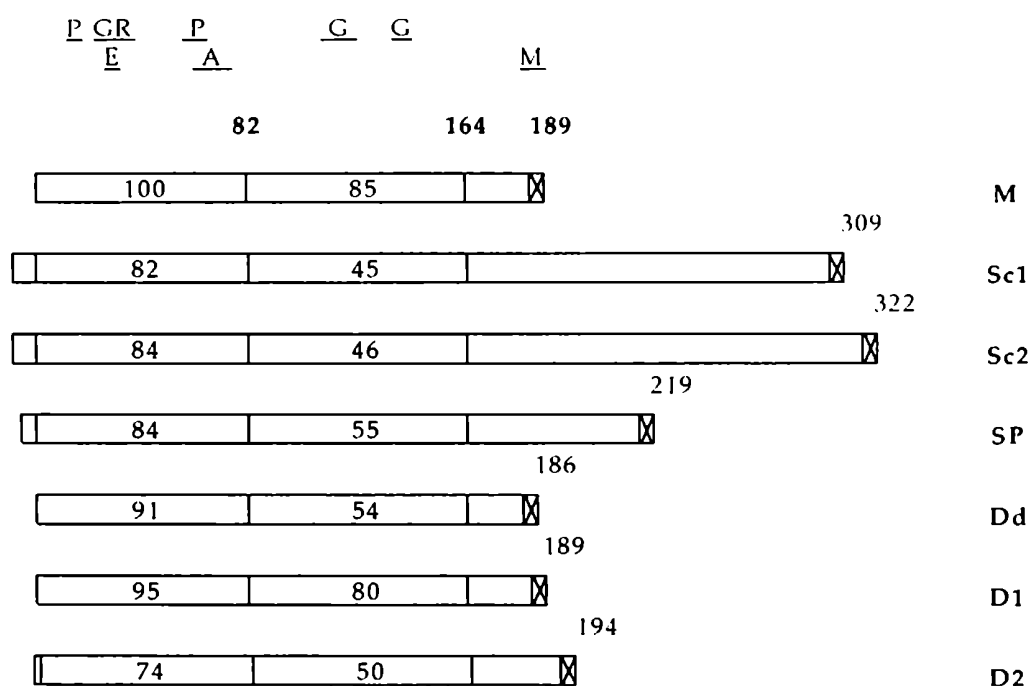


Figura 1.6. Representación esquemática de la estructura de las proteínas ras en diferentes especies.

Fuentes de las proteínas ras: M, mamíferos; SC, *S. cerevisiae*; SP, *S. pombe*; Dd, *D. discoideum*; D, *D. melanogaster*.

Las regiones críticas que unen nucleótidos de guanina están indicadas por la interacción con fosfatos (P), anillo de ribosa (R) y anillo de guanina (G). Otras abreviaturas: región crítica del dominio del efector (E), epítopo altamente conservado (A), sitio de localización en la membrana (M). Los números de los residuos de aminoácidos están colocados fuera de los rectángulos, mientras que los números dentro de los mismos representan el grado de homología, en porcentaje, entre los residuos de aminoácidos respecto a M-ras.

Las proteínas RAS1 y RAS2 tienen homología en los últimos 8 aminoácidos del extremo amino-terminal. Esta región contiene una secuencia CAAX (donde C es una cisteína, A es un aminoácido alifático y X es el aminoácido carboxi-terminal). Esta secuencia es requerida para la isoprenilación de diferentes proteínas: factor sexual α en *S. cerevisiae*, proteínas de la familia de GTPasa, entre las que se encuentran las proteínas ras de mamíferos y RAS1 y RAS2 de *S. cerevisiae* (Clarke, 1992).

Se ha descrito que la sustitución de ciertos residuos de aminoácidos activan el potencial de transformación de la proteína ras de mamíferos, asociado a la disminución de la actividad de GTPasa (Fasano y col., 1984; DeFeo-Jones y col., 1985). Han sido sustituidos los residuos 12 (glicina), 13 (glicina), 59 (alanina), 61 (glutamina) y 66 (glutamato); estos residuos están conservados en las proteínas de levadura y se encuentran en las posiciones 19, 20, 66, 68 y 70 (Barbacid, 1987; Bollang y Mc Cormick, 1991; Lowy, 1993; Wood y col., 1994). Alteraciones de la proteína de levadura en estos aminoácidos producen importantes cambios en la fisiología celular.

La disrupción de alguno de los dos genes *RAS* en *S. cerevisiae* no tiene efecto aparente sobre el crecimiento en un medio de cultivo con una fuente de carbono fermentable y las células exhiben una meiosis normal. Ninguno de los genes RAS1 o RAS2 son por sí mismos genes esenciales; sin embargo, la disrupción de ambos genes es letal en células haploides. Esporas sin ambos genes no son viables, ya que fallan en la formación de gemas. Las esporas *ras1 ras2* están bloqueadas en la fase G1 del ciclo celular (Tatchell y col., 1984).

Diferentes experimentos de complementación entre los genes *RAS* de levadura y los de mamíferos indicaron:

- 1-El producto de los genes *RAS* de levadura y mamíferos exhiben una alta homología estructural.
- 2-La expresión de las proteínas de levaduras conteniendo alteraciones en los residuos de aminoácidos análogos a los responsables en mamíferos de convertir proteínas ras normales en proteínas transformantes, afecta la

fisiología de la célula de levadura.

3-Los productos de los genes *ras* de mamíferos y levaduras exhiben similar actividad de GTPasa y unión de nucleótidos de guanina.

4-La región amino-terminal de los genes *RAS* de levadura puede reemplazar la región amino-terminal de los genes *ras* de mamíferos en la transformación de células HHH3T3 con tal que las mutaciones que lo activen sean introducidas en los genes de levadura.

Mientras las observaciones descriptas indican las similitudes de las proteínas *ras* de mamíferos y levaduras también existen algunas diferencias:

1- Los genes *ras* de mamíferos no pueden sustituir eficientemente los genes *RAS* de levaduras en el crecimiento de estas últimas células.

2-El gen *RAS1* de levadura con las mutaciones que lo activan no es capaz de transformar células HHH3T3.

Estas son diferencias netas entre el sistema de mamíferos y levaduras y es necesario separar las similitudes así como las diferencias entre ambos sistemas.

Transcriptos de los genes *RAS1* y *RAS2* han sido detectados usando sondas de ADN para una porción única del gen que codifica para la porción carboxi-terminal de la proteína. Ambos ARNm están poliadenilados y tienen un tamaño de 1200 nucleótidos aproximadamente. El ARNm del *RAS2* puede aparecer como dos bandas que migran muy cercanas, también ha sido detectado uno o más transcriptos mayores para cada gen.

La expresión de los dos genes *RAS* en *S. cerevisiae* parece estar bajo muy distintos mecanismos de regulación:

1-Los niveles relativos de los dos mensajeros son diferentes; el ARNm del *RAS2* parece estar presente en mayor cantidad que el ARNm del *RAS1*.

2-La cantidad del ARNm del *RAS1* está significativamente reprimida en cultivos crecidos con fuentes de carbono no fermentables tales como etanol, glicerol o acetato; por otra parte el ARNm del *RAS2* está expresado estimativamente con igual eficiencia en todas las fuentes de carbono

La represión del ARNm del *RAS1* por fuentes de carbono no fermentables explica la escasa capacidad de crecimiento de células de levadura *ras2* en dichos medios de cultivo (Tatchell y col., 1985); como en estas células el gen *RAS2* está interrumpido, la represión de la expresión del gen *RAS1*, conduce a una situación idéntica a lo que ocurre en las células doble mutantes *ras1 ras2* (Brevario y col., 1986).

Además de la regulación por la fuente de carbono, la expresión de los ARNm de ambos genes *RAS* parece estar regulada por la fase de crecimiento (Brevario y col., 1988). Durante el crecimiento exponencial en células crecidas con glucosa como fuente de carbono en el medio de cultivo se observa reducción de la síntesis del ARNm del *RAS1*. La adición de glucosa a las células en la proximidad de la fase estacionaria falla en la inducción de la expresión del ARNm del *RAS1*. En contraste, el nivel de ARNm del *RAS2* permanece elevado durante la fase exponencial y está presente aún cuando las células entran en la fase estacionaria (Werner-Washburne y col., 1993).

Diferentes autores han demostrado que ambas proteínas *RAS* en *S. cerevisiae* son fosforiladas *in vivo* o *in vitro* por acción de la proteína quinasa A. La fosforilación *in vitro* de la proteína *RAS2* inhibe la activación de la adenilato ciclasa, resultado que estaría de acuerdo con una regulación por producto final de la vía *RAS/PKA* (Resnick y Racker, 1988; Cobitz y col., 1989).

A semejanza de las proteínas *ras* de mamíferos, ambas proteínas *RAS1* y *RAS2* exhiben actividades de unión a nucleótidos de guanina. La unión es específica para GDP o GTP; otros nucleótidos tal como GMP, GMPc, ATP, UTP y CTP no compiten en la unión a GDP; UTP exhibe una leve competencia cuando es agregado en cantidades excesivas (Tamanai y col., 1984).

Se observan alteraciones en la actividad de GTPasa cuando se reemplazan los aminoácidos glicina por valina en la posición 19 (mutante *RAS2val19*) y alanina por treonina en la posición 66.

Por determinación directa de los niveles intracelulares de AMPc en diferentes cepas de *S. cerevisiae* se demostró que los genes *RAS* están involucrados en la formación de AMPc. La concentración de AMPc en una cepa silvestre es de 1,8 pmol/mg. proteína mientras que la concentración en una mutante que expresa la proteína RAS2val19 está incrementada, siendo de 7,9 pmol/mg. proteína. Una cepa *ras1* tiene los niveles intracelulares de AMPc levemente disminuidos y en una cepa *ras2* estos niveles son por lo menos cuatro veces menores que en una cepa silvestre.

La participación de los genes *RAS* en la producción de AMPc fue confirmada al comparar la actividad de la adenilato ciclasa en preparaciones de membrana de varias cepas.

La actividad de la adenilato ciclasa en preparaciones crudas de membranas de una cepa silvestre, ensayada en presencia de iones Mg^{2+} , aumentó aproximadamente cuatro veces al agregarse un análogo no hidrolizable de GTP. Las membranas preparadas de una mutante que expresa la proteína RAS2val19 mostraron cuatro veces más actividad de la adenilato ciclasa que la de las membranas de la cepa silvestre (Broek y col., 1985). La actividad de la adenilato ciclasa de una cepa mutante *ras1 ras2* fue indetectable.

1.3.2. Modificaciones post-transcripcionales de las proteínas *RAS* en *S. cerevisiae*.

El producto del gen *RAM1* es requerido en la etapa de la adición del grupo farnesilo, presumiblemente como subunidad de una enzima farnesil transferasa heterodimérica (Fujiyama y col., 1987); el producto del gen *RAM2* es la otra subunidad (Clarke, 1992; Boguski y Mc Cormick, 1993).

El producto del gen *STE14* es una metil transferasa responsable de la carboxi-metilación de la proteína RAS; pero teniendo en cuenta que mutantes *ste14* son viables pero estériles (Clarke, 1992), dicho paso no es esencial para la asociación de la proteína RAS a la membrana plasmática. En cambio, los procesos de farnesilación y de carboximetilación sí son esenciales para la síntesis del factor sexual α (Tamanoi, 1988). Además, se produce una acilación con ácidos grasos en ambas proteínas RAS (Fujiyama y Tamanoi, 1986). Todas estas modificaciones post-transcripcionales son esenciales para la ubicación de las proteínas RAS en la membrana plasmática y para su funcionalidad.

1.3.3 Proteínas que participan en la regulación de las proteínas RAS.

La activación de la vía RAS/PKA sólo necesita incrementos absolutos de la cantidad de la proteína RAS en su forma activa, unida a GTP. Un posible modelo de la hidrólisis del GTP unido a la proteína RAS de *S. cerevisiae* es un evento estocástico, el cual procede independientemente de su interacción con la adenilato ciclasa. La velocidad de hidrólisis por las proteínas IRA impone un tiempo de estimulación sobre su blanco. La proporción relativa de la forma activa, unida a GTP, y la inactiva, unida a GDP, de la proteína RAS está determinada por las velocidades de dos reacciones competitivas: 1- la reacción de intercambio GDP/GTP catalizada por la proteína CDC25 y 2- la reacción GTPásica estimulada por las proteínas IRA1 y IRA2.

Está ampliamente aceptado que la proteína codificada por el gen *CDC25* actúa como un activador de la reacción de intercambio de nucleótidos de guanina, de manera similar a la GNRP (Proteínas que Liberan Nucleotidos de Guanina) de mamíferos, uniéndose a las proteínas RAS. Esta idea está basada en numerosos datos genéticos y bioquímicos

(Petitjean y col., 1990; Haubruck y Mc Cormick, 1991; Pardo y col., 1993; Jacquet y col., 1994).

Se ha propuesto que la proteína CDC25 es una fosfo-proteína que en respuesta a la adición de glucosa, en células ayunadas, se hiperfosforila muy rápidamente, por acción de la proteína quinasa A. Está demostrado que concomitantemente con la hiperfosforilación, la proteína CDC25 se relocaliza parcialmente en el citoplasma, reduciendo así su disponibilidad para la proteína RAS activa localizada en membrana (Schomerus y col., 1990; Gross y col. 1992).

Se encontraron diferentes genes relacionados al gen *CDC25*; el extremo carboxi-terminal de la proteína codificada por el gen *SCD25* tiene el mismo efecto que la proteína CDC25 (Créchet y col., 1990) y alta homología; la región carboxi-terminal del gen *BUD5* presenta una homología del 25% con los genes *CDC25* y *SCD25*, pero la proteína BUD5 no puede sustituir la función de la CDC25 (Powers y col., 1991).

Tanaka y col. (1989 y 1990) han demostrado que los genes *IRA*, *IRA1* e *IRA2* codifican para proteínas, extremadamente extensas, que actúan como reguladores negativos de la actividad de la proteína RAS2, con acción antagónica a las proteínas de la familia de CDC25. Ambos genes *IRA* poseen un alto porcentaje de homología a los genes de la familia GAP (Proteína Activadora de la actividad de GTPasa) de mamíferos (Haubruck y Mc Cormick, 1991; Lowy 1991 y 1993).

En la secuencia de aminoácidos de la proteína IRA1 existen dos sitios potenciales de fosforilación por la proteína quinasa A; dichos sitios pueden estar involucrados en la regulación por "feedback" de la actividad de la adenilato ciclasa por la proteína quinasa A (Tanaka y col., 1989).

1.3.4. Proteínas que actúan "downstream" a las proteínas RAS.

La estimulación de la adenilato ciclasa, por la proteína RAS-GTP requiere del producto del gen *SRV2* (Fedor-Chaikin y col., 1990), una proteína de 70 KDa denominada CAP, que co-purifica con la adenilato ciclasa (Field y col., 1990). La proteína CAP es bifuncional, su extremo amino-terminal incrementa la estimulación de la adenilato ciclasa mediada por las proteínas RAS; dicha activación no es totalmente dependiente de la presencia de la proteína CAP, ya que mutantes *srv2*, son viables. De la deleción de su extremo carboxi-terminal resultan variados fenotipos (Werner-Washburne y col., 1993).

En *S. cerevisiae* el gen *CYR1* codifica para la adenilato ciclasa, una proteína asociada a membrana de 200 KDa (Matsumoto y col., 1984), que sintetiza AMPc y consta de por lo menos cuatro dominios: el extremo amino-terminal, la porción central, la región catalítica y el extremo carboxi-terminal (Kataoka y col., 1985; Field y col., 1990). La región central está compuesta por repetición de una secuencia de 23 aminoácidos, es rica en residuos de leucina y crítica para la interacción con la proteína RAS (Suzuki y col., 1990 y 1993).

El aislamiento de cepas de levaduras deficientes en la actividad de la adenilato ciclasa (Matsumoto y col., 1982a; 1982b y 1983), ha permitido acceder al estudio de esta proteína, por técnicas de genética y biología molecular (Casperson y col., 1985; Kataoka y col., 1985; Mitsuzawa y col., 1989).

Dos fosfodiesterasas, que degradan AMPc a 5'AMP, fueron identificadas en *S. cerevisiae*; una con baja afinidad, codificada por el gen *PDE1* y la otra, de alta afinidad, codificada por el gen *PDE2*. Deficiencia de una o ambas proteínas no producen importantes incrementos en la concentración intracelular de AMPc. En la mayoría de las condiciones, las mutantes *pde* presentan un fenotipo similar al de una cepa silvestre

(Wilson y col., 1993). Los constantes niveles de AMPc en mutantes *pde1* y *pde2* son una evidencia de un riguroso mecanismo de control por "feedback" por la proteína quinasa A, sobre los niveles del nucleótido cíclico. El mecanismo preciso de regulación no es bien conocido, pero las proteínas RAS y CDC25 han sido fosforiladas *in vivo* (Cobitz y col., 1989; Gross y col. 1992).

La señal producida por la estimulación de la adenilato ciclasa por las proteínas RAS, a través del incremento de los niveles intracelulares de AMPc, origina una estimulación de la proteína quinasa A. Las subunidades catalíticas de esta quinasa están codificadas por tres genes: *TPK1*, *TPK2* y *TPK3* (Toda y col., 1987a). La delección de dos de los genes *TPK* no es letal, pero al menos un gen funcional es requerido para el crecimiento celular normal.

La subunidad regulatoria de la proteína quinasa A, está codificada por el gen *BCY1* (Toda y col., 1987b; Cannon y Tatchell, 1987). Esta proteína modula la actividad de la quinasa, por unión a la subunidad catalítica, a bajas concentraciones intracelulares de AMPc. Altas concentraciones de AMPc promueven la disociación de ambas subunidades, permitiendo que la subunidad catalítica fosforile una variedad de sustratos.

Mutantes *bcy1* son dominantes sobre mutaciones tales como: *cyr1*, *ras1 ras2* y *cdc25* (Matsumoto y col., 1983), ya que se activa la proteína quinasa A independientemente de los niveles de AMPc, produciendo una variedad de fenotipos (Cannon y col., 1990).

Los blancos de la proteína quinasa A incluyen las enzimas involucradas en el metabolismo de carbohidratos de reserva (Ortiz y col., 1983; François y col., 1988 y 1991; Wills, 1990; Fernández-Bañares y col., 1991), enzimas situadas en puntos estratégicos en las vías glicolíticas y gluconeogénesis (François y col., 1984; Gancedo y col., 1983), enzimas requeridas en el metabolismo de aminoácidos, fosfolípidos, apocitocromos, factores de transcripción asociados a la expresión de genes específicos, proteínas involucradas en la producción de AMPc e

indudablemente un sustancial número de proteínas no identificadas (Uno y col., 1984; Kinney y col., 1990; Plummer y Mattoon, 1992; Bell y col., 1977; Marchler y col., 1993; Cobitz y col., 1989; Gross y col. 1992).

Los fenotipos que presentan las cepas que poseen mutaciones en la vía RAS/PKA pueden ser divididos en dos categorías dependiendo si la mutación resulta en una activación (*bcy1*, *ira* o *RAS2^{val19}*) o inactivación (*cyr1*, *cdc25* o *ras1ras2*) de la proteína quinasa A (Tatchell, 1986; Gibbs y Marshall, 1989; Broach, 1991).

En general, una alta actividad de proteína quinasa A induce una pérdida en el almacenamiento de carbohidratos de reserva (glucógeno y trehalosa), activación de la vía glucolítica, inducción de la transcripción de un número de genes específicos del crecimiento, represión de algunas proteínas protectoras de estrés y una baja modulación de la vía RAS/PKA; en células haploides permite un crecimiento mitótico normal, mientras que en células diploides está inhibida la esporulación (Cameron y col., 1988; Malone, 1990; Matsuura y col., 1990).

En una situación recíproca, bajos niveles de proteína quinasa A producen acumulación de carbohidratos de reserva, activación de la gluconeogénesis, reducción de la transcripción de un número de genes específicos del crecimiento e inducción de varias proteínas relacionadas con el estrés celular.

La disponibilidad de estudios genéticos en levaduras permitió identificar un número importante de nuevos genes involucrados en la vía RAS/PKA (Bussereau y col., 1992; Matsuura y Anraku, 1993 y 1994; Shirayama y col., 1994).

1.3.5. La vía RAS/PKA como transductor de señales externas.

Trehalosa, un disacárido no reductor de D-glucosa, es un componente importante de reserva en levaduras, especialmente en esporas. Altos niveles de trehalosa son esenciales para la supervivencia celular en condiciones de ayuno, también tienen función crioprotectora y preservan la integridad de las membranas durante la deshidratación (Panek, 1991; Eleutherio y col., 1993).

La actividad de la trehalasa, la enzima involucrada en la degradación de trehalosa, está regulada por shock térmico (Hottiger y col., 1987) y por los niveles intracelulares de AMPc (Ortiz y col., 1983; Hottiger y col., 1989)

Cuando se incuban células desreprimidas, es decir ayunadas o crecidas en medios de cultivo que contienen una fuente de carbono no fermentable, con glucosa u otros hidratos de carbono fermentables, inhibidores de proteínas o protonóforos, se produce un aumento transitorio de los niveles intracelulares de AMPc en *S. cerevisiae* (Mbonyi y col., 1988; Argüelles y col., 1990; Han y col., 1994), no dependiente del descenso concomitante del pH intracelular (Thevelein y col., 1987a y 1987b).

La utilización de mutantes de *S. cerevisiae* en el estudio de la inducción de los niveles de AMPc por glucosa, permitió establecer que es necesaria la presencia de una de las tres quinasas, hexoquinasa 1, hexoquinasa 2 o glucoquinasa y una de las dos hexoquinasas cuando se induce con fructosa (Beullens y col., 1988); esta acción se encuentra reprimida por glucosa (Argüelles y col., 1990; Mbonyi y col., 1990).

Se comprobó que es requerida la vía RAS funcionalmente activa, en particular de la proteína CDC25, para obtener los rápidos incrementos de AMPc intracelular en células desreprimidas y estimuladas con glucosa (Van Aelst y col., 1990 y 1991); de acuerdo a los conocimientos de este mecanismo de transmisión de señales, se propuso un mecanismo de

acción (Argüelles y col., 1990; Thevelein, 1991).

Teniendo en cuenta que la adición de compuestos nitrogenados, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ o aminoácidos, no producen aumentos en la concentración de AMPc (Thevelein, 1984), pero sí activación de enzimas dependientes de la misma, se han realizado medidas de la actividad de trehalasa para cuantificar el efecto antes descrito y poder determinar cómo es el mecanismo de acción de estos compuestos (Thevelein y Beullens, 1985).

Thevelein (1991) propuso un mecanismo de acción diferente al de la glucosa para los compuestos nitrogenados, los mismos tendrían acción sobre la actividad de la proteína quinasa A o su subunidad catalítica, a través de intermediarios proteicos, sin involucrar los niveles de AMPc. Este modelo se confirma con medidas de la actividad de trehalasa realizadas en células desreprimidas, de mutantes *bcy1*, incubadas con diferentes compuestos nitrogenados (Durnez y col., 1994).

OBJETIVOS

En levaduras *Saccharomyces cerevisiae* la incorporación de aminoácidos es mediada por sistemas de transporte específicos y un sistema general para D y L-isómeros de la mayoría de los aminoácidos (Grenson y col., 1970) denominada permeasa general de aminoácidos, GAP1. Además algunos L-aminoácidos utilizan más de un sistema de transporte, con diferentes afinidades y capacidades. La multiplicidad de los sistemas transportadores permite a las células de levadura, un eficiente crecimiento en medios de cultivo con una amplia variación en la fuente de nitrógeno o carbono, así como la concentración de protones en el medio extracelular.

En el caso de L-leucina se demostró que su entrada, en *S. cerevisiae* es mediada por la GAP1 (Grenson y col., 1970) y por dos sistemas denominados S1 y S2 (Ramos y col., 1980). Estos últimos autores observaron que los tres sistemas participan en la entrada de L-leucina en cepas silvestres, pero sólo operan los sistemas S1 y S2 en una mutante *gap1* (Kotliar y col., 1994). El sistema S1 es de alta afinidad y baja capacidad, y opera preferentemente a bajas concentraciones de L-leucina externa, mientras que el sistema S2 es de baja afinidad y alta capacidad y opera preferentemente a altas concentraciones de L-leucina externa.

Las tres permeasas, GAP1, S1 y S2 son amonio-sensibles. El mecanismo de regulación de la actividad de la GAP1 por la fuente de nitrógeno ha sido estudiado por el grupo de Grenson. Por otro lado, el efecto de los iones amonio sobre los sistemas S1 y S2 ha sido descrito por Kotliar y col. (1990 y 1994).

A partir del descubrimiento de los genes *RAS* en *S. cerevisiae* y de la participación de las proteínas RAS en la regulación del metabolismo celular a través de la vía RAS/PKA, se propusieron numerosas investigaciones para indagar la participación de estos genes y las proteínas por ellos codificadas en los diversos procesos celulares.

Los blancos de la proteína quinasa A incluyen las enzimas involucradas en el metabolismo de carbohidratos de reserva, enzimas situadas en puntos estratégicos en las vías glicolíticas y gluconeogénesis, enzimas requeridas en el metabolismo de

aminoácidos, fosfolípidos, apocitocromos, factores de transcripción asociados a la expresión de genes específicos, proteínas involucradas en la producción de AMPc, e indudablemente un sustancial número de proteínas no identificadas.

En la presente tesis se ha investigado la participación del gen RAS2 en el proceso de entrada e incorporación de L-leucina en *S. cerevisiae*. En la elección del tema propuesto se tuvieron en cuenta los resultados en diferentes líneas de investigación.

En células eucariotas la incorporación de L-aminoácidos es la etapa limitante para su posterior metabolismo, esto incluye biosíntesis de proteínas, metabolitos intermedios, reparto del grupo amonio y utilización del residuo carbonado. Todos estos procesos están involucrados en el crecimiento celular.

Los genes *RAS* de *S. cerevisiae* están estructural y funcionalmente relacionados con los genes *ras* de mamíferos y están involucrados en la síntesis de AMPc. Mutaciones que alteran los residuos de los aminoácidos en diferentes posiciones producen cambios drásticos en la fisiología de la célula de levadura.

Ramos y col. (1977) observaron que en levaduras de *S. cerevisiae* preincubadas con altas concentraciones externas de AMPc, producía un aumento en las velocidades de transporte de L-leucina. Resultados similares sobre el transporte de aminoácidos, fueron presentados en levaduras de la especie *Schizosaccharomyces pombe* (Foury y Goffeau, 1975; Sychrová y col., 1989).

Considerando lo expuesto anteriormente se decidió estudiar el efecto de la vía RAS2/AMPc sobre la actividad de los sistemas transportadores de L-leucina. Para ello se utilizaron cepas con distinta actividad de la proteína RAS2 :

- Cepas con mutaciones en el genoma (308, 301 y 131).
- Cepas MMY2 y MMY2/H3 transformadas con un plásmido centromérico, de copia única, llevando el oncogen *RAS2val19*.

De acuerdo a lo expuesto los objetivos de esta tesis fueron los siguientes:

1-Investigar los procesos de incorporación de L-leucina en las diferentes cepas de *S. cerevisiae*, antes descritas.

2-Determinar los parámetros cinéticos de los sistemas transportadores de L-leucina en las cepas seleccionadas.

3-Establecer la relación entre los sistemas transportadores presentes y los sistemas previamente descritos para L-leucina.

Con el fin de cumplir con los lineamientos establecidos se estableció el siguiente plan de trabajo:

1-Determinar las condiciones previas al estudio del proceso de incorporación de L-leucina en los diferentes cepas de *S. cerevisiae* empleadas.

1.1 Obtención de cepas de levaduras transformadas por los plásmidos YCp50 e YCp50RAS2*val19*.

1.2 Verificación de los diferentes fenotipos celulares.

1.3 Crecimiento en diferentes medios de cultivo ricos y mínimos con diversas fuentes de nitrógeno.

2-Estudio del transporte de L-leucina en las diferentes cepas empleadas.

2.1 Cinética del proceso de incorporación.

2.2 Análisis de las constantes cinéticas de los sistemas transportadores.

2.3 Inhibición del transporte por otros aminoácidos.

2.4 Incorporación de L-¹⁴C citrulina.

3.1. Cepas de levadura empleadas.

Los experimentos se realizaron con las siguientes cepas de *Saccharomyces cerevisiae* :

Cepas	Genotipo
308	MAT α <i>leu2 ura3 his3 lis-trp1</i>
301	MAT α <i>leu2 ura3 his3 lis-trp1 RAS2val19</i>
131	MAT α <i>leu2 ura3 his3 lis-trp1 ras2::LEU2</i>
MMY2	MAT α <i>ura3</i>
MMY2 YCp50	MMY2 transformada por YCp50
MMY2 YCp50RAS2val19	MMY2 transformada por YCp50RAS2val19
MMY2/H3	MAT α <i>ura3 gap1</i>
MMY2/H3 YCp50	MMY2/H3 transformada por YCp50
MMY2/H3 YCp50RAS2val19	MMY2/H3 transformada por YCp50RAS2val19

Las cepas 308, 301, 131, MMY2, MMY2 YCp50 y MMY2 YCp50 RAS2val19 fueron provistas por el Prof. Dr. James R. Mattoon, Director del Biotechnology Center. University of Colorado. Colorado Springs. Colorado. USA.

La cepa MMY2/H3 isogénica a la cepa MMY2, fue aislada por su resistencia a D-histidina(Kotliar y col., 1994).

3.2. Medios de cultivo.

Medio	Composición por litro
YPD 0.3%	Extracto de levadura 10g, peptona 10g y D-glucosa 3g.
YPD	Extracto de levadura 10g, peptona 10g y D-glucosa 20g.
YPDA	Extracto de levadura 10g, peptona 10g, D-glucosa 20g y sulfato de adenina 80mg.
VJ	Medio Vavra y Johnson(Vavra y col, 1956) modificado: Biotina 0,4%, pantotenato de Ca ²⁺ 10mg, i-inositol 200 mg, tiamina-HCl 88mg, piridoxina-HCl 24mg, nicotinamida 5mg, ZnSO ₄ .7H ₂ O 17,4mg, CuSO ₄ .5H ₂ O 1mg, FeSO ₄ . 7H ₂ O 7,3mg, MgSO ₄ .7H ₂ O 1g, KH ₂ PO ₄ 4g, NaH ₂ PO ₄ 12g, ácido succínico 11,8g, D-glucosa 20g (pH=4,5).
VJNH ₄ ⁺	(NH ₄) ₂ SO ₄ 3g, como fuente de nitrógeno.
VJPro	L-prolina 1g, como fuente de nitrógeno.
VJPro+D-his	L-prolina 1g, como fuente de nitrógeno y 1,5g de D-histidina (pH=5,0).
VJCit	L-citrulina 175mg, como fuente de nitrógeno (pH=5,0).

Los medios mínimos sólidos son llevados a pH=5,0 con KOH 3M y todos los medios sólidos requeridos contienen 30g/l de agar.

Cuando las cepas presentan auxotrofías los medios mínimos, fueron suplementados con uracilo 10mg/l, L-leucina 10mg/l, L-histidina 10mg/l, L-lisina 40mg/l y L-triptofano 10mg/l. Todas estas soluciones fueron esterilizadas por filtración a través de filtros Millipore GS de 0,22 μm de diámetro de poro y adicionadas al medio de cultivo ya autoclavado.

3.3. Mantenimiento de las condiciones de esterilidad.

Los medios de cultivo y todo el material empleado en la siembra o en técnicas que requieran esterilidad se esterilizaron a 1,1-1,3 atmósferas, en un autoclave (Lutz Ferrando) durante 15-20 minutos, salvo que se indique lo contrario.

Las condiciones de esterilidad durante los repiques y siembras se lograron y mantuvieron utilizándose luz UV y/o un flujo laminar

3.4. Mantenimiento de las cepas de levadura.

Las cepas fueron mantenidas en medios sólidos por repiques periódicos en tubos con tapa a rosca. Luego de crecer las levaduras a 30°C, durante 36-48 horas, los tubos se conservan a 4°C hasta el momento de su utilización.

Para las cepas 308, 301 y 131 se utilizó medio YPDA; para la cepa MMY2 y su mutante MMY2/H3 se utilizó medio VJNH₄⁺(ura), para las cepas transformadas se utilizó medio VJNH₄⁺.

Ademas se mantuvieron reservas congeladas a -70°C en los medios de crecimientos correspondientes con el agregado antes de congelar de glicerol, a una proporción final del 30% v/v.

2,5. Condiciones de crecimiento.

Para los cultivos se utilizaron erlenmeyers conteniendo el medio líquido requerido, ocupando del 10% al 20% del volumen total, en un agitador New Brunswick modelo G-10, operando a 200-230 rpm, a una temperatura de 30°C , en cámara de cultivo y en oscuridad.

Esta metodología fue estandarizada ya que tanto la aireación como la agitación son dos variables importantes, determinantes de la eficiencia del crecimiento de cultivos de levadura.

El inóculo sembrado (1-3% del volumen final del medio de cultivo), preparado con células crecidas en el mismo medio líquido, se dejó desarrollar durante 18-24 horas.

Las células se cosecharon al final de la fase logarítmica por centrifugación a $3000 \times g$ durante 10 min a 4°C , en centrífuga refrigerada Sorvall, modelo RC-5C y lavadas dos veces con agua recientemente bidestilada. El sedimento obtenido (células del medio) es resuspendido en agua y utilizado inmediatamente.

3.6. Curvas de crecimiento.

Teniendo en cuenta que las condiciones fisiológicas celulares, en medios de cultivo adecuados, varían en los diferentes estadios de crecimiento es necesario un conocimiento adecuado de las curvas de crecimiento para los estudios experimentales posteriores.

Los cultivos de levadura exhiben curvas de crecimiento características, por poseer tres zonas o fases diferentes:

1- Fase de inducción o inicial comúnmente denominada "fase lag". 2- Fase exponencial de crecimiento en la cual la velocidad de división del microorganismo es constante comúnmente denominada "fase log". 3- Fase estacionaria, donde la velocidad de crecimiento es nula.

En general el crecimiento celular se sigue por medida de absorbancia a longitudes de onda entre 570 y 660 nm ($\lambda_{570\text{nm}}$ y $\lambda_{660\text{nm}}$) en un espectrofotómetro Beckman, modelo DU-65.

El tiempo transcurrido entre una división celular y la siguiente se conoce con el nombre de "tiempo de generación". En un cultivo de levadura, el tiempo total de generación para todos los individuos de la población es constante y se denomina "tiempo de generación medio" (G) cuya determinación es importante para la descripción del crecimiento de un microorganismo.

A partir de la pendiente del $\ln(\lambda_{570\text{nm}})$ en función del tiempo se determinó G. Las ecuaciones básicas son:

$$dN/dt = \mu \cdot N$$

que da la velocidad de aumento de una población. Si se integra:

$$\ln(N/N_0) = \mu \cdot t$$

$$\ln 2 = \mu \cdot G$$

Donde: N = número de células.

No = número inicial de células.

μ = constante específica de crecimiento.

t = tiempo.

El valor de μ varía tanto con el tipo de medio de cultivo empleado como con las características genéticas de las levaduras.

Por lo tanto, para calcular G, a partir de dos puntos de la curva de crecimiento en la fase exponencial N y No:

$$G = (t \cdot \ln 2) / \ln(N/No)$$

Cuando la absorbancia es usada como medida del número de células:

$$G = (t \cdot \ln 2) / \ln(A/Ao)$$

Procedimiento:

Se prepararon inóculos de suspensión de células de levadura en 10 ml del mismo medio de cultivo a utilizar, con los que se sembró el medio de cultivo cuya Λ_{570nm} resultó aproximadamente 0,080.

Se tomaron alícuotas aseptícamente, a distintos tiempos y se determinó su Λ_{570nm} obteniéndose el conjunto de datos que graficados permitieron establecer el tiempo en alcanzar la fase logarítmica tardía y el tiempo de generación.

3.7. Aislamiento de los plásmidos.

Las cepas de bacterias *Escherichia coli* utilizadas para la amplificación y aislamiento de los plásmidos, fueron DH5 α YCp50 y DH5 α YCp50RAS2*val19*.

Las bacterias fueron crecidas durante la noche, a 37°C con agitación, en medio Luria-Bertani + ampicilina (Extracto de levadura 0,5g%, Triptona 1,0g%, NaCl 1,0g%, pH final 7,2; en los casos requeridos la concentración de ampicilina fue 10 μ g/ml).

Para una minipreparación se utilizó 1ml del medio de cultivo, se centrifugó en una centrifuga Eppendorf, modelo 5414 y el precipitado obtenido fue resuspendido en 100 μ l de una solución de D-glucosa 50mM, Tris-HCl 25mM pH=8,0 y EDTA 10mM, se incubó en hielo por 3 minutos. Se adicionó 200 μ l de una solución de NaOH 0,2N y SDS 1%p/v y se agitó con vortex, incubándose en hielo durante 4 minutos; luego se agregó 150 μ l de una solución de AcoK 5M: AcoII glacial 5M, 1:2, incubándose en hielo por 5 minutos. Se centrifugó a máxima velocidad durante 5 minutos, se transfirió el sobrenadante a un tubo limpio y se adicionó 1ml de etanol absoluto frío, incubándose a -70°C por 30 minutos. Se centrifugó a máxima velocidad durante 15 minutos, el sobrenadante fue descartado y el precipitado fue resuspendido en agua bidestilada. Todo el procedimiento se realizó en condiciones de esterilidad.

3.8. Transformación de las células de levadura.

Las células de levadura se transformaron mediante la técnica de electroporación (Becker and Guarante, 1991), utilizando un electroporador modelo Electroporator II (Invitrogen. San Diego. CA. USA) en las siguientes condiciones: 50 μ F de capacitancia y 100 W de resistencia. La fuente de poder se ajustó a voltaje 1500V, corriente 25 mA y 25 W.

3.9. Control celular.

Se realizó la verificación de la presencia de los diferentes fenotipos celulares (crecimiento en medios sintéticos de las células transformadas, distintas cantidades de carbohidratos totales en las diferentes cepas mutantes *RAS2* y control de la mutación *gap1*) que permitieron asegurar el genotipo de las diferentes cepas empleadas.

3.9.1. Verificación de la presencia de los plásmidos.

Teniendo en cuenta que el plásmido YCp50 y su derivado YCp50*RAS2val19* poseen el gen *URA3*, con el cual se complementa la auxotrofia de las cepas MMY2 y su mutante *gap1* MMY2/113, todas las células transformadas por ambos plásmidos, crecen en medios mínimos sin la adición de dicho suplemento.

3.9.2. Determinación de mutantes *gap1*.

En las mutantes *gap1*, la falta de actividad del sistema general de aminoácidos, se traduce en un crecimiento deficiente al emplearse L-citrulina como fuente de nitrógeno en el medio de cultivo, VJCit (Grenson y col; 1970). Las células de levadura normales no crecen, en medio VJPro+D-his, en estas condiciones la GAP1 está desreprimida y los D-aminoácidos, que son tóxicos para el metabolismo celular, son transportados por este sistema. Esta metodología es adecuada cuando las células no poseen auxotrofia para ningún aminoácido (Rytka; 1975).

3.9.3. Tinción de carbohidratos.

La determinación semicuantitativa del contenido de glucógeno y trehalosa celular, con las consideraciones realizadas por Tatchell y col. (1985); se determinó rutinariamente según la técnica descrita por Panek (1991 y 1994), en células crecidas en diferentes medios sólidos, por tinción con una solución de lugol (I₂ 0,2% p/v y IK 0,4% p/v, en solución acuosa).

3.10. Suspensión celular de trabajo.

La concentración celular se estimó midiendo la absorbancia a 570 nm (A_{570nm}) de una dilución 1:100 de la suspensión celular en agua destilada e interpolándose este valor obtenido en una curva de

calibración de $\Lambda 570\text{nm}$ en función de los mg de peso seco/ml. El valor de la concentración así establecido se consideró aproximado y permitió obtener en los experimentos la concentración deseada.

Al término de cada experimento se verificó la misma mediante el método de pesada de una alícuota de trabajo, secada en estufa a 104°C , hasta peso constante.

3.11. Ensayo de entrada e incorporación de L- ^{14}C aminoácido.

Suspensiones conteniendo 5 mg de peso seco/ml de células en buffer ftalato ácido de potasio (FIK) 20 mM, pH 4,5, se incubaron a 30°C con L- ^{14}C leucina 0,05mM para el sistema S1, 1,0mM para el sistema S2 y con L- ^{14}C (ureido) citrulina 0,05mM para el sistema GAP1.

En los tiempos indicados se tomaron alícuotas de $200\mu\text{l}$ de la mezcla de reacción que se filtraron inmediatamente a través de membranas filtrantes Schleicher & Schüll 3362 de $0,45\mu\text{m}$ de diámetro de poro .

Los filtros se lavaron tres veces con 2,0 ml de FIK 20 mM y, luego de secados, se determinó su contenido del L- ^{14}C aminoácido por centelleo líquido.

3.12. Determinación de parámetros cinéticos.

Para la determinación de las velocidades iniciales (v_i) de entrada de L-leucina se tomaron muestras inmediatamente después del agregado del L- ^{14}C aminoácido t_0 (ligado), $t_0+1,5\text{min}$ y $t_0+3\text{min}$ (entrada). Las velocidades iniciales se calcularon a partir de la pendiente de la regresión lineal para cada concentración externa del L-aminoácido.

Cuando se trabajó con el sistema de la GAP1 desreprimida, el cálculo de las velocidades iniciales se realizó hasta un minuto por la rápida saturación que presenta dicho sistema en estas condiciones de trabajo.

3.13. Determinación del efecto de L-aminoácidos sobre la entrada de L-leucina.

Los ensayos se realizaron con concentraciones externas del L-aminoácido inhibidor diez veces mayores que las del aminoácido radiactivo adicionados simultáneamente (t_0) a la suspensión celular, tomándose muestras de $200\mu\text{l}$ de la mezcla de reacción a $t_0+3\text{min}$.

3.14. Determinación de la concentración intracelular de protones.

3.14.1. Método de distribución de ácido ^{14}C (carboxi) benzoico.

La distribución se midió en condiciones similares a las descritas para el estudio de la entrada de L- ^{14}C aminoácido (amortiguador, filtros, etc) reemplazando el aminoácido por ácido ^{14}C (carboxi) benzoico $50\mu\text{M}$, alcanzándose el equilibrio después de la incubación a 30°C por 3 minutos (De Bongioanni y Ramos, 1988).

A partir de la radiactividad retenida en las membranas filtrantes y el volumen de agua intracelular, $2\mu\text{l}/\text{mg}$ peso seco (Cooper., 1982), se determinó la concentración intracelular del ácido (c_i). La concentración externa del ácido (c_e) se calculó restando a los μmoles totales de ácido ^{14}C benzoico por muestra, los μmoles retenidos en las membranas y consideró el volumen extracelular igual al volumen de la muestra.

La concentración intracelular de protones ($[\text{H}^+]_i$), se calculó mediante la siguiente ecuación:

$$[\text{H}^+]_i = [c_i/c_e (1/ [\text{H}^+]_e + 1/ K_d) - 1/ K_d]^{-1}$$

donde: $[\text{H}^+]_e$ es la concentración extracelular de protones determinada por la solución amortiguadora y K_d es la constante de disociación del ácido benzoico ($6,31 \cdot 10^{-5}$).

3.14.2. Método espectrofluorométrico.

El método empleado requirió la determinación de la intensidad de fluorescencia a dos longitudes de onda diferentes estableciendo una relación de intensidades que depende del pII intracelular.

Como colorante fluorescente se utilizó diacetato de fluoresceína (FDA), el cual difunde al interior celular, transformándose en un compuesto activo-fluorescente a través de la acción de esterasas intracelulares (Slavik, 1982).

Se tomaron alícuotas de 1 ml de las suspensiones celulares conteniendo 10-12 mg peso seco/ml las cuales se centrifugaron en una centrífuga Eppendorf durante 2 minutos, el sedimento se lavó y resuspendió en FHK 20 mM, pH 4,5.

Se tomó una alícuota de esta suspensión y se incubó 10 minutos a 30°C con una solución en acetona de FDA, a una concentración final de 100µM. Luego de la incubación, la suspensión se centrifugó y el sedimento se lavó y resuspendió nuevamente en igual volumen de FHK 20 mM, pH 4,5.

Para la realización del espectro se utilizó un espectrofluorómetro Jasco FP-770. A 1,5ml de FHK 20 mM, pH 4,5 conteniendo 100µl de suspensión celular se realizó un espectro de excitación entre 400-500 nm emitiendo a 520 nm. Se calculó el cociente entre las intensidades entre 490 y 435 nm (I_{490}/I_{435}) y se calculó el logaritmo natural del mismo.

Posteriormente se calculó el pII intracelular por medio de una curva de calibración $\ln(I_{490}/I_{435})$ en función del pII que se realizó de la siguiente forma: Se realizaron los espectros de excitación de las soluciones de amortiguador FHK 20 mM, con diferentes pII mas 100µl de FDA 1,0mM hidrolizado en amortiguador Tris-HCl 100 mM, pH 7,0.

3.15. Determinación de la radiactividad de las muestras.

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

Las membranas filtrantes fueron colocadas en viales de vidrio, con una mezcla centelladora compuesta por 2,5-difenil oxazol (PPO) 2,5g; 1,4-bis 5-fenil-2 oxazoil benceno (POPOP) 50mg por litro de tolueno.

3.16. Diseño experimental y expresión de resultados.

Para la correcta interpretación de los resultados en el estudio de la incorporación de L- ^{14}C leucina es conveniente definir lo que se considera como valores de ligado, entrada e incorporación del L-aminoácido en levaduras.

En todos los casos t_0 es el tiempo de adición de L- ^{14}C aminoácido a la suspensión de levadura en agitación en el baño de incubación a 30°C. Esto representa los valores de unión o ligado del aminoácido a la barrera de permeabilidad.

Las muestras t_0+t se consideran la expresión de otros procesos; si t es mayor de 3 minutos, los valores son los de incorporación total del aminoácido y son el resultado de la entrada y acumulación en las células.

Cuando t es menor o igual a 3 minutos, t_0+t corresponde a la entrada, transporte o influjo.

Los valores de L- ^{14}C aminoácido se expresan en $\mu\text{moles/gramo}$ de peso seco de células.

En todas las determinaciones la toma de muestras, filtración y lavado de las células requirió 5-8 segundos. Los experimentos se realizaron por triplicado y los valores presentados son su promedio. La desviación de estos valores con respecto a la media fue del 5%.

3.17. Reactivos empleados.

Extracto de levadura, peptona, triptona y agar son de DIFCO.

L- ^{14}C leucina, L- ^{14}C (ureido) citrulina y ácido ^{14}C (carboxi) benzoico de New England Nuclear, USA.

Los D y L-aminoácidos, $\alpha\text{-D}(+)\text{ glucosa}$, AMPc, FIK, AcoK, Tris-HCl, EDTA, SDS, PPO y vitaminas de SIGMA, Chemycal Co. St. Louis, Mo. USA.

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, KH_2PO_4 y NaH_2PO_4 son de E. Merk, Darmstadt, Alemania.

Todos los demás reactivos son de pureza analítica.

RESULTADOS

CAPITULO 4

ESTUDIO DEL PROCESO DE TRANSPORTE DE L-LEUCINA EN CEPAS CON MUTACIONES NUCLEARES EN EL GEN RAS2.

	página
4.1. Crecimiento celular en diferentes medios de cultivo.	47
4.2. Control celular.	48
4.3. Entrada e incorporación de L- ¹⁴ C leucina.	48
4.4. Determinación de la concentración intracelular de protones.	54
4.5. Parámetros cinéticos de los sistemas transportadores.	55
4.6. Efecto de L-aminoácidos sobre la entrada de L- ¹⁴ C leucina.	60
4.7. Incorporación de L- ¹⁴ C citrulina.	62

ESTUDIO DEL PROCESO DE TRANSPORTE DE L-LEUCINA EN CEPAS
CON MUTACIONES NUCLEARES EN EL GEN RAS2

4.1. Crecimiento celular en diferentes medios de cultivo.

Teniendo en cuenta los valores obtenidos para el tiempo de generación y el tiempo en que se alcanza la fase logarítmica tardía, Tabla 4.1, no se encuentran diferencias significativas en el crecimiento de las distintas cepas en los medios utilizados.

Tabla 4.1. Parámetros de crecimiento.

Cepas	medios de cultivo	G	τ
	YPD		
308		163	17
301		177	17
131		206	17
	VJNII ₄ ⁺		
308		225	14
301		212	14
131		196	14
	VJPro		
308		267	14
301		209	14
131		255	14

Tiempo de generación G (min) y tiempo en que se alcanza la fase logarítmica tardía τ (horas).

4.2. Control celular.

Se realizó periódicamente la tinción de carbohidratos totales, con solución de Lugol, como se indica en materiales y métodos. Las mutantes *RAS2^{val19}* poseen la menor concentración de carbohidratos totales, las células normales una cantidad intermedia y las mutantes *ras2::LEU2* la mayor concentración. Esto se deduce de la intensidad de color después de estar las células 40-60 seg en contacto con el colorante, desarrollando color desde amarillo pardo a marrón intenso, como se observa en la Figura 4.1. La intensidad de color es independiente del medio de cultivo en el que se crecen las células.

4.3. Entrada e incorporación de L-¹⁴C leucina.

La entrada de L-¹⁴C leucina en las cepas 308, 301 y 131 se determinó en células crecidas en medio complejo YPD y en medios mínimos VJNH₄⁺ y VJPro, descritos en materiales y métodos.

La entrada e incorporación de L-¹⁴C leucina presenta trazados lineales para las tres cepas en los diferentes medios de cultivo, tanto a baja como a alta concentración externa del aminoácido: 0,05 y 1,0 mM respectivamente. En ningún caso se observa saturación en el transporte de L-leucina hasta T₀+3min tal como se muestra en las Figuras 4.2, 4.3 y 4.4.

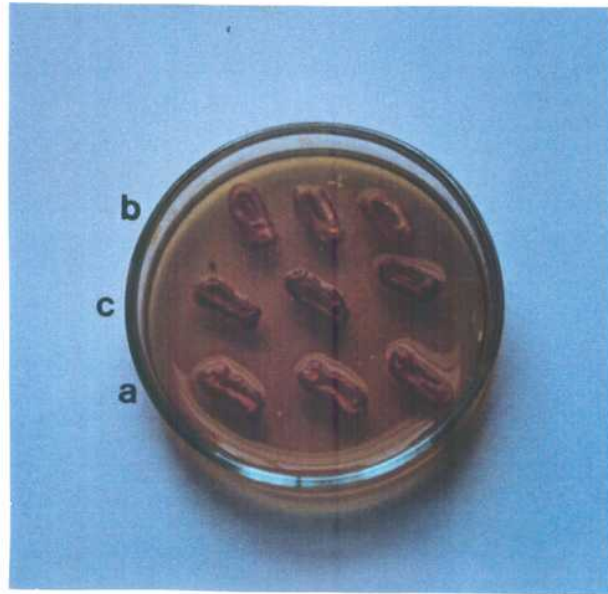


Figura 4.1. Tinción de carbohidratos totales.
Cepas 308 (a), 301 (b) y 131 (c) crecidas en medio YPD.

En el medio rico YPD la relación de concentración de L-leucina interna a externa c_i/c_e a $T_0+3\text{min}$ es de 11, 15 y 6 para las cepas 308, 301 y 131 respectivamente cuando la concentración externa de L-leucina es 0,05 mM, a la mayor concentración externa de L-leucina 1,0 mM esta relación es de 4, 2 y 2 respectivamente, además la cepa 131 presenta las menores velocidades iniciales de entrada de L- ^{14}C leucina, como se presenta en la Figura 4.2.

Según se observa en la Figura 4.3, en medio mínimo VJNH_4^+ , los valores de entrada de L-leucina son sensiblemente menores que los presentados en medio rico y la relación c_i/c_e para las cepas 308 y 301 es de 6 mientras que para la cepa 131 es de 4, a baja concentración de L-leucina. A alta concentración externa del aminoácido las células no lo acumulan. En este medio mínimo, con una fuente rica de nitrógeno, la velocidad de entrada de L-leucina en la cepa 131 es casi la mitad que las presentadas en las cepas 308 y 301 en iguales condiciones.

determinaciones similares se realizaron en las tres cepas crecidas en medio mínimo VJPro , Figura 4.4. Los valores de c_i/c_e para la menor concentración del aminoácido son: 16, 8 y 22 en las cepas 308, 301 y 131 respectivamente. Para la mayor concentración de L-leucina, las cepas 308 y 131 concentran L-leucina entre 2 y 3 veces mientras que en la cepa 301 no se concentra el aminoácido.

Es interesante destacar que en la cepa 131 crecida en VJPro la actividad de transporte es mayor que la observada en medio YPD y VJNH_4^+ .

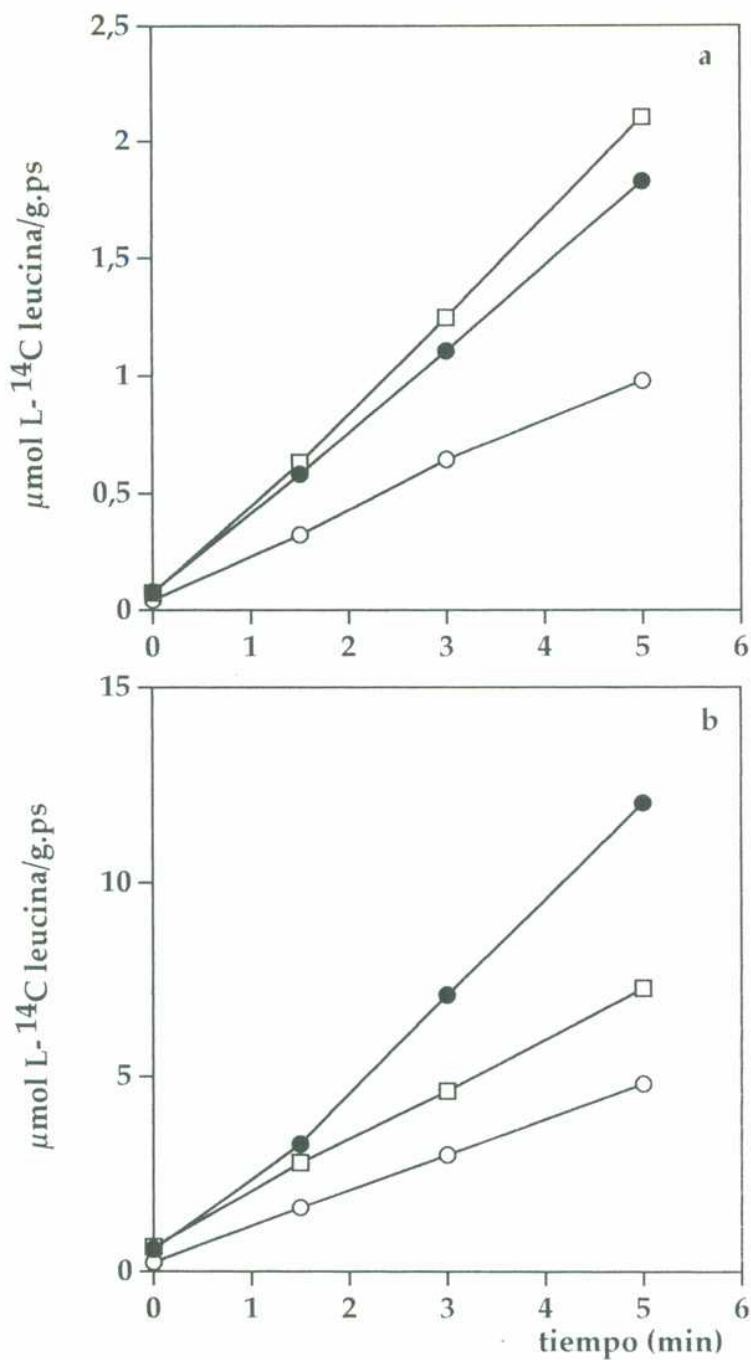


Figura 4.2. Incorporación de L-¹⁴C leucina en las cepas 308, 301 y 131 crecidas en medio YPD.

La incorporación de L-leucina se midió en células de las cepas 308 (●), 301 (□) y 131 (○). Las concentraciones de L-leucina externa fueron 0,05mM (a) y 1,0mM (b).

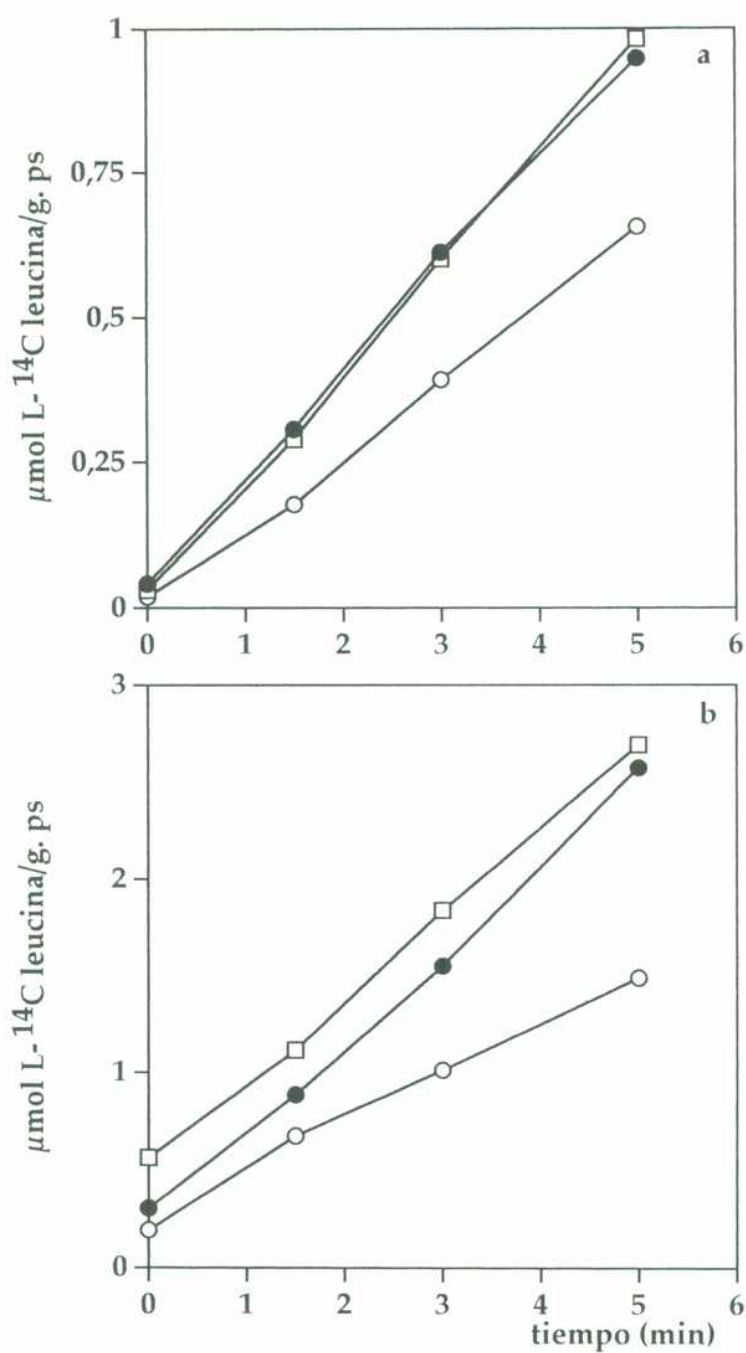


Figura 4.3. Incorporación de L- ^{14}C leucina en las cepas 308, 301 y 131 crecidas en medio VJNH_4^+ .

La incorporación de L-leucina se midió en células de las cepas 308 (●), 301 (□) y 131 (○). Las concentraciones de L-leucina externa fueron 0,05mM (a) y 1,0mM (b).

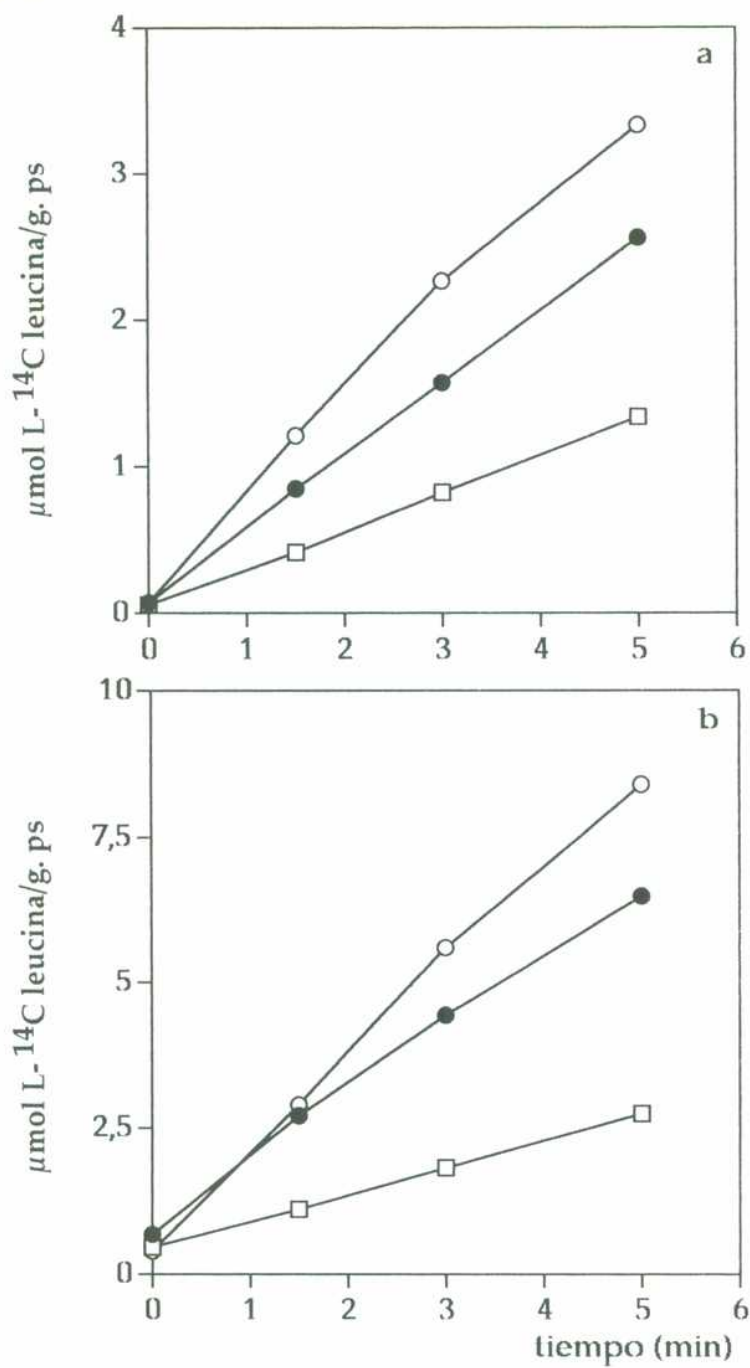


Figura 4.4. Incorporación de L- ^{14}C leucina en las cepas 308, 301 y 131 crecidas en medio VJPro.

La incorporación de L-leucina se midió en células de las cepas 308 (●), 301 (□) y 131 (○). Las concentraciones de L-leucina externa fueron 0,05mM (a) y 1,0mM (b).

4.4. Determinación de la concentración intracelular de protones.

El pH intracelular (pHi) se determinó utilizando dos metodologías: por distribución de ácido benzoico y por espectrofluorometría.

La distribución de ácido ^{14}C benzoico se analizó en las mismas condiciones empleadas para el ensayo de incorporación de L-aminoácidos. Los valores de pHi, se mantienen constantes entre los 3 y 10 minutos de incubación con el ácido. En la Tabla 4.2 se observa el promedio de los valores obtenidos en células crecidas en los diferentes medios de cultivos.

Por espectrofluorometría, los resultados no fueron reproducibles como con la metodología anterior.

Tabla 4.2. Concentración intracelular de protones.

Cepas	medios de cultivo	pHi
308	YPD	6,04
301		5,81
131		5,91
308	VJNH ₄ ⁺	5,46
301		5,60
131		5,76
308	VJPro	5,60
301		5,78
131		5,64

No se ha encontrado ninguna relación entre las pequeñas diferencias obtenidas en los valores de pHi relacionadas con el transporte de L-leucina.

4.5. Parámetros cinéticos de los sistemas transportadores.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en 4.3, se consideró conveniente caracterizar los sistemas presentes en los diferentes medios de cultivo.

En la Figura 4.5 se muestra la representación de Eadie-Hofstee en células crecidas en medio YPD, en cada una de las cepas pueden caracterizarse cinéticamente dos sistemas para el transporte de L-leucina.

En medio VJNH₄⁺ dos sistemas median el transporte en las cepas 308 y 131 mientras que puede caracterizarse un sólo sistema en la cepa 301, como se observa en la Figura 4.6.

Cuando L-prolina es la fuente de nitrógeno presente en el medio de cultivo, también se detectan dos sistemas de transporte en las tres cepas como en células crecidas en medio rico, Figura 4.7. Los valores de los parámetros cinéticos obtenidos se presentan en la Tabla 4.3. Observándose que las constantes cinéticas son del mismo orden en las tres cepas crecidas en los diferentes medios de cultivo.

Los valores obtenidos indican que en estas condiciones experimentales las actividades presentes corresponden a las encontradas para los sistemas S1 y S2 y que ambos sistemas son sensibles a la presencia de iones amonio.

A diferencia de lo descrito por otros autores donde en células crecidas en medio VJPro se caracterizó cinéticamente un único sistema de transporte para L-leucina con alta afinidad y alta capacidad; en las cepas 308, 301 y 131 se caracterizaron dos sistemas para L-leucina, uno de alta afinidad y baja capacidad y otro de baja afinidad y alta capacidad.

Para poder confirmar la presencia o ausencia de actividad de la permeasa general de aminoácidos (GAP1), se decidió realizar ensayos de competencia de la entrada de L-¹⁴C leucina por L-citrulina y estudiar la

entrada e incorporación de L-¹⁴C citrulina, en condiciones de represión y desrepresión de este sistema, ya que dicho aminoácido es transportado casi exclusivamente por el sistema general de aminoácidos.

Tabla 4.3. Parámetros de cinéticos.

Cepas	medios de cultivo	K _{T1}	J _{máx1}	K _{T2}	J _{máx2}
YPD					
308		0,06	0,71	0,40	2,80
301		0,05	0,84	0,44	1,84
131		0,08	0,49	0,56	1,37
VJNH ₄ ⁺					
308		0,04	0,38	0,25	0,56
301		0,03	0,29		
131		0,06	0,18	0,33	0,42
VJPro					
308		0,04	0,88	0,10	1,07
301		0,02	0,46	0,13	0,70
131		0,04	1,02	0,28	1,56

Los valores se calcularon por el método de análisis de Eadie-Hofstee según las representaciones de las Figuras 4.5, 4.6 y 4.7. K_T se expresa en mM y J_{máx} en $\mu\text{mol/g}\cdot\text{min}$.

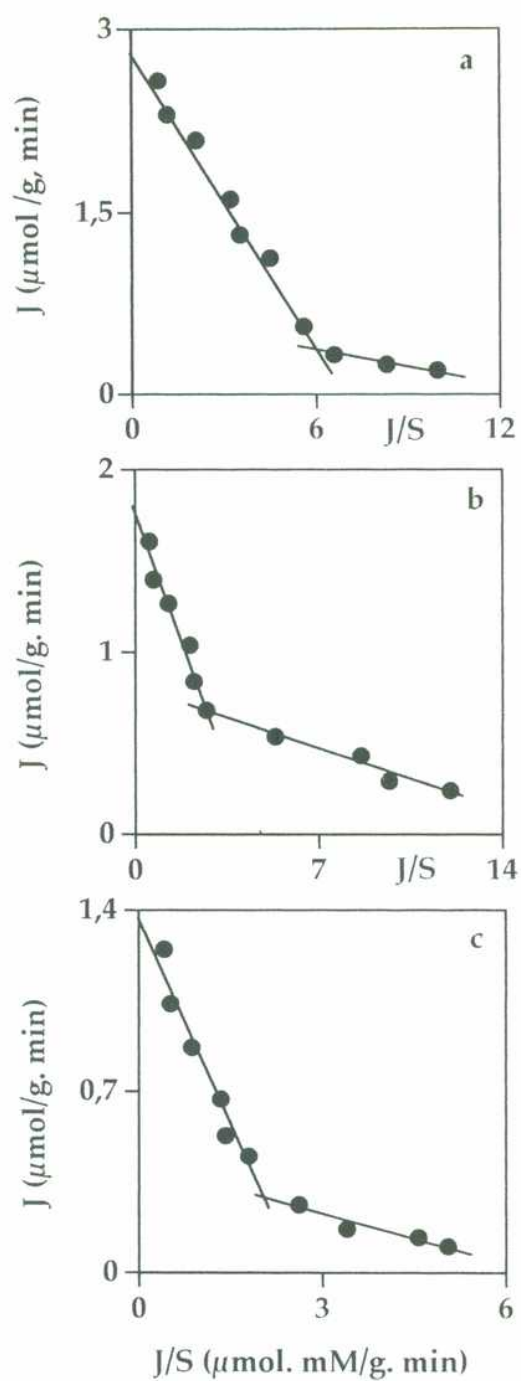


Figura 4.5. Cinética de entrada de L-leucina en las cepas 308 (a), 301 (b) y 131 (c) crecidas en medio YPD. Representaciones de Eadie-Hofstee.

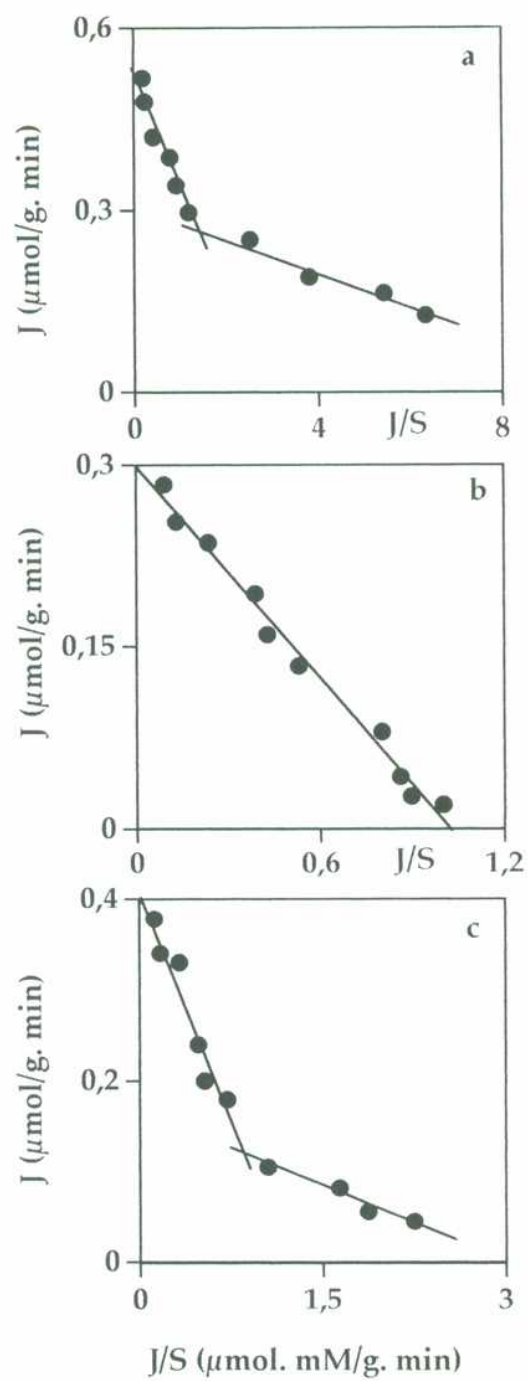


Figura 4.6. Cinética de entrada de L-leucina en las cepas 308 (a), 301 (b) y 131 (c) crecidas en medio VJNH_4^+ . Representaciones de Eadie-Hofstee.

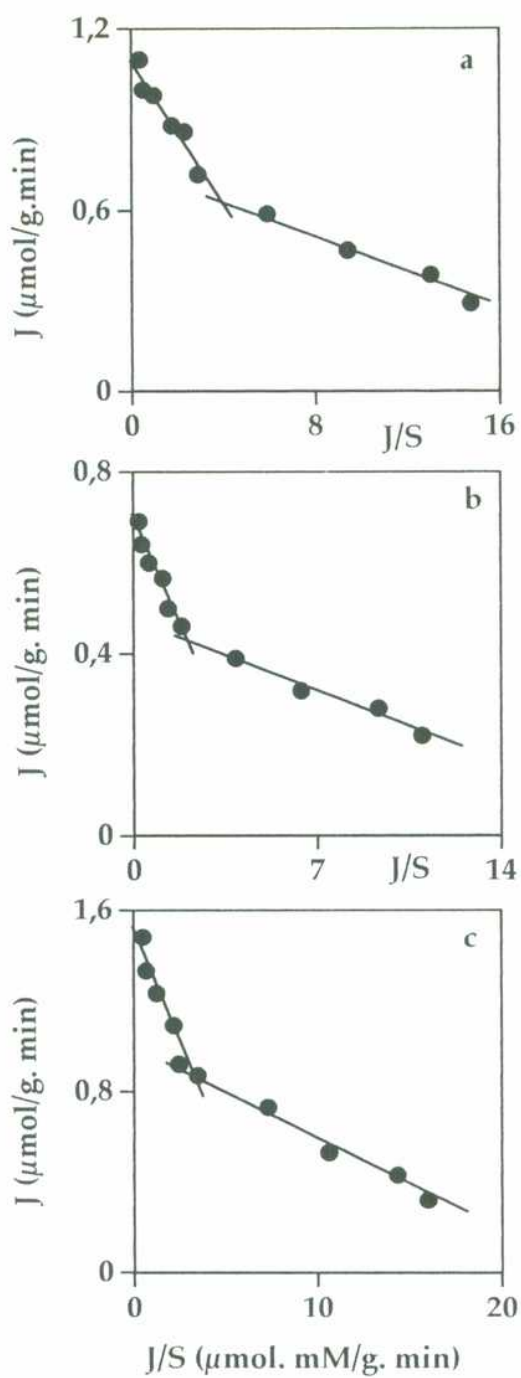


Figura 4.7. Cinética de entrada de L-leucina en las cepas 308 (a), 301 (b) y 131 (c) crecidas en medio VJPro. Representaciones de Eadie-Hofstee.

4.6. Efecto de L-aminoácidos sobre la entrada de L-¹⁴C leucina.

Estos experimentos se realizaron con dos concentraciones externas de L-¹⁴C leucina, 0,05 y 1,0 mM, y concentraciones diez veces mayores del L-aminoácido ensayado como inhibidor en el medio de incubación.

En la Tabla 4.4 se resumen los porcentajes de inhibición a $t=3\text{min}$ respecto del control.

L-Prolina se utilizó como control negativo, ya que es transportado casi exclusivamente por un sistema específico de transporte en *S. cerevisiae* (Lasko y Brandriss, 1981); el transporte de L-prolina no es significativo por la GAP1 (Grenson y col., 1970) y este aminoácido no es transportado por los sistemas S1 y S2 (Kotliar y col., 1994). El control positivo utilizado fue L-leucina no radiactiva. Para cuantificar la actividad de la GAP1, se analizó el efecto de L-citrulina sobre la entrada de L-¹⁴C leucina, ya que dicho aminoácido es transportado esencialmente por dicha permeasa (Grenson y col., 1970).

En células crecidas en los diferentes medios empleados no se observa inhibición con el aminoácido L-citrulina, aún en medio VJPro.

No se realizó el ensayo de crecimiento en placa en medio VJPro+D-his ya que estas cepas presentan auxotrofia para múltiples aminoácidos, como se indicó en materiales y métodos.

Tabla 4.4. Ensayos de inhibición.

Inhibidor	medios de cultivo	[L-leucina] _{ext} =0,05mM			[L-leucina] _{ext} =1,0mM		
		308	301	131	308	301	131
YPD							
control		1,116	1,258	0,659	7,225	4,668	3,011
L.-leucina		0,313 (72)	0,360 (71)	0,206 (69)	1,611 (78)	1,106 (76)	0,812 (73)
L.-citrulina		1,108 (1)	1,225 (3)	0,637 (3)	7,178 (1)	4,351 (7)	3,025 (0)
L.-prolina		1,090 (2)	1,264 (0)	0,634 (4)	6,929 (4)	4,452 (5)	2,961 (3)
VJNH ₄ ⁺							
control		0,612	0,599	0,380	1,541	1,838	1,012
L.-leucina		0,447 (73)	0,107 (82)	0,092 (76)	0,566 (63)	0,652 (65)	0,320 (68)
L.-citrulina		0,601 (2)	0,549 (8)	0,371 (2)	1,473 (4)	1,715 (7)	0,962 (5)
L.-prolina		0,608 (1)	0,582 (3)	0,373 (2)	1,530 (1)	1,768 (4)	0,948 (6)
VJPro							
control		1,457	0,832	2,297	4,397	1,789	5,601
L.-leucina		0,329 (77)	0,166 (80)	0,554 (76)	1,345 (69)	0,513 (71)	1,137 (80)
L.-citrulina		1,401 (4)	0,851 (0)	2,125 (8)	4,142 (6)	1,734 (3)	5,219 (7)
L.-prolina		1,469 (0)	0,813 (2)	2,226 (3)	4,269 (3)	1,687 (6)	5,387 (4)

Valores controles en μ moles de L-¹⁴C leucina/g.ps cél a $t=3$ min. Entre paréntesis, porciento de inhibición.

4.7. Incorporación de L-¹⁴C citrulina.

El ensayo de incorporación de L-¹⁴C citrulina se realiza en medios VJNH₄⁺ y VJPro a concentración externa 0,05 mM. Como se muestra en la Tabla 4.5 , no se encuentran diferencias significativas entre los valores de velocidades iniciales de entrada de L-citrulina en medio VJNH₄⁺ ó VJPro , siendo estos en todos los casos muy bajos.

Tabla 4.5. Velocidades iniciales de entrada de L-citrulina en medios VJNH₄⁺ y VJPro.

Cepas	[L-citrulina] _{ext} =0,05 mM		
	VJNH ₄ ⁺	VJPro	viPro/viVJNH ₄ ⁺
308	0,003	0,003	1
301	0,002	0,001	0,5
131	0,002	0,002	1

Velocidades iniciales de entrada en μ moles de L-¹⁴C citrulina/g. min.

Estos resultados permiten afirmar que estas cepas de levadura no poseen actividad de GAP1 en las condiciones de desrepresión comúnmente empleadas.

Por lo tanto, es posible estudiar la dependencia de las actividades de los dos sistemas de transporte de L-leucina S1 y S2 en función de la vía RAS/AMPC.

En la Tabla 4.6 se muestran los valores de velocidades iniciales de entrada de L-¹⁴C leucina para las cepas 308, 301 y 131 en los medios VJPro y VJNH₄⁺ y el cociente viPro/viNH₄⁺ para cada concentración externa utilizada.

La relación viPro/viNH₄⁺ es de 3 para la cepa 308, reduciéndose a 1 para la cepa 301 y es máxima, con un valor entre 5-7 para la cepa 131.

Tabla 4.6. Relación de los valores de velocidades iniciales de entrada de L-leucina en medios VJNH₄⁺ y VJPro.

Cepas	[L-leucina]ext=0,05mM			[L-leucina]ext=1,0mM		
	VJNH ₄ ⁺	VJPro	viPro/viNH ₄ ⁺	VJNH ₄ ⁺	VJPro	viPro/viNH ₄ ⁺
308	0,18	0,50	3	0,42	1,25	3
301	0,20	0,29	1	0,42	0,45	1
131	0,11	0,73	7	0,26	1,24	5

Velocidades iniciales de entrada en μ moles de L-¹⁴C leucina/g.min.

En la cepa 301 no se observa efecto de desrepresión cuando las células se crecen en medio VJPro. Se encontró la mayor diferencia en

las actividades de ambos sistemas de transporte entre los medios VJPro y VJNH₄⁺ en la cepa 131, donde el gen *RAS2* está interrumpido por el gen *LEU2*.

De esta manera, se puede afirmar que las cepas de *Saccharomyces cerevisiae* empleadas, no presentan actividad de GAP1 y la diferente actividad presente de la proteína codificada por el gen *RAS2* afecta la regulación por la fuente de nitrógeno del medio de cultivo de los sistemas transportadores de L-leucina S1 y S2.

CAPITULO 5

ESTUDIO DEL PROCESO DE TRANSPORTE DE L-LEUCINA EN LAS CEPAS MMY2 Y MMY2/H3.

	página
5.1. Entrada e incorporación de L- ¹⁴ C leucina.	65
5.2. Determinación de la concentración intracelular de protones.	66
5.3. Parámetros cinéticos de los sistemas transportadores.	70
5.4. Efecto de L-aminoácidos sobre la entrada de L- ¹⁴ C leucina.	76
5.5. Incorporación de L- ¹⁴ C citrulina.	77

ESTUDIO DEL PROCESO DE TRANSPORTE DE L-LEUCINA EN LAS CEPAS MMY2 Y MMY2/H3.

En la cepa MMY2 y su mutante *gap1* MMY2/H3 ya han sido caracterizados los sistemas de transporte de L-leucina: GAP1, S1 y S2, en células ayunadas y energizadas (Kotliar y col., 1994); estas condiciones son diferentes a las empleadas en este trabajo: células del medio según materiales y métodos.

5.1. Entrada e incorporación de L-¹⁴C leucina.

Las células se crecen en medios ricos YPD e YPD 0,3% y medios mínimos VJNII₄⁺ y VJPro. Los ensayos de entrada e incorporación de L-¹⁴C leucina se realizan según materiales y métodos.

En las cepas MMY2 y MMY2/H3 se observa que para ambas concentraciones externas de L-leucina los trazados de incorporación son lineales hasta $t_0+5\text{min}$; en cambio, para la cepa MMY2 crecida en medio VJPro se observa saturación en la entrada de L-leucina a tiempos muy cortos, menores de 1,5 minutos, a baja concentración del aminoácido como se muestra en las Figuras 5.1, 5.2 y 5.3.

En la cepa MMY2 a concentración externa 0,05 mM, L-leucina es concentrada por las células a $t_0+3\text{min}$ 8 y 14 veces cuando es crecida en medio YPD e YPD 0,3% respectivamente, a la concentración externa 1,0 mM la relación c_i/c_e es 2 y 3 para células crecidas en ambos medios de cultivo. En la Figura 5.1 se presentan los gráficos de entrada e incorporación de L-¹⁴C leucina, para ambos medios complejos.

La relación c_i/c_e para las cepas MMY2 y MMY2/H3 crecidas en medio mínimo $VJNH_4^+$ es aproximadamente 3 para 0,05 mM de L-leucina externa; a 1,0 mM el transporte en ambas cepas no es concentrativo. Se presentan los gráficos de entrada e incorporación en este medio de cultivo en la Figura 5.2.

En la Figura 5.3 se representan los trazados de la incorporación de L-leucina en ambas cepas crecidas en medio VJPro. En la cepa silvestre la relación c_i/c_e , es de 26 y 13 a baja y alta concentración de L-leucina externa respectivamente. Para la cepa MMY2/H3 dicha relación es de 8 y 1,5 para 0,05 y 1,0 mM de L-leucina externa, respectivamente.

5.2. Determinación de la concentración intracelular de protones.

Se realizó la determinación del pH_i sólo por distribución de ácido ^{14}C benzoico; no se pudo realizar la medida del pH_i intracelular por el método espectrofluorométrico porque el colorante utilizado no se incorporó en la cepa MMY2, su mutante *gap1* y sus respectivas cepas transformadas.

No se observan diferencias en los valores obtenidos entre los 3 y 10 minutos de incubación. En la Tabla 5.1 se observan los valores promedios obtenidos en las células crecidas en los diferentes medios de cultivos.

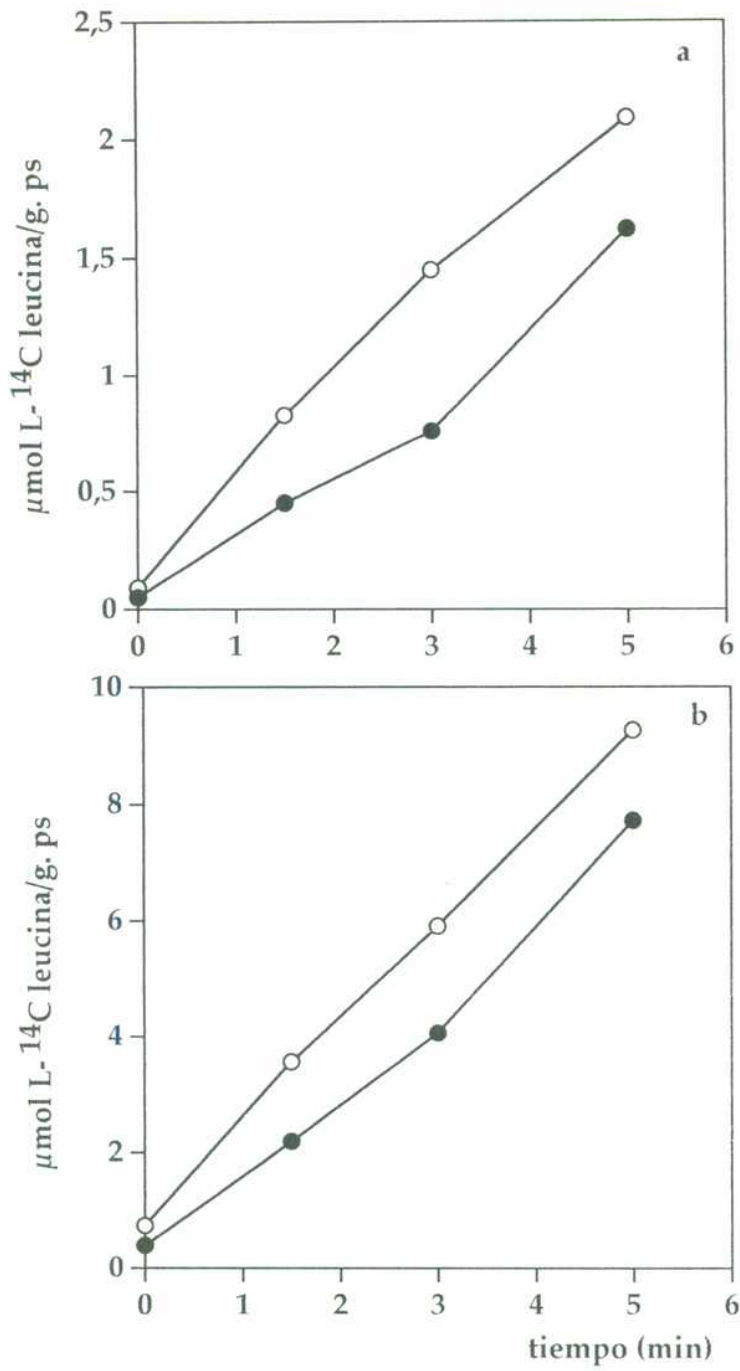


Figura 5.1. Incorporación de L-¹⁴C leucina en la cepa MMY2 crecida en medio YPD e YPD 0,3%.

La incorporación de L-leucina se midió en células de la cepa MMY2 crecida en medio YPD (●) e YPD 0,3% (○). Las concentraciones de L-leucina externa fueron 0,05mM (a) y 1,0mM (b).

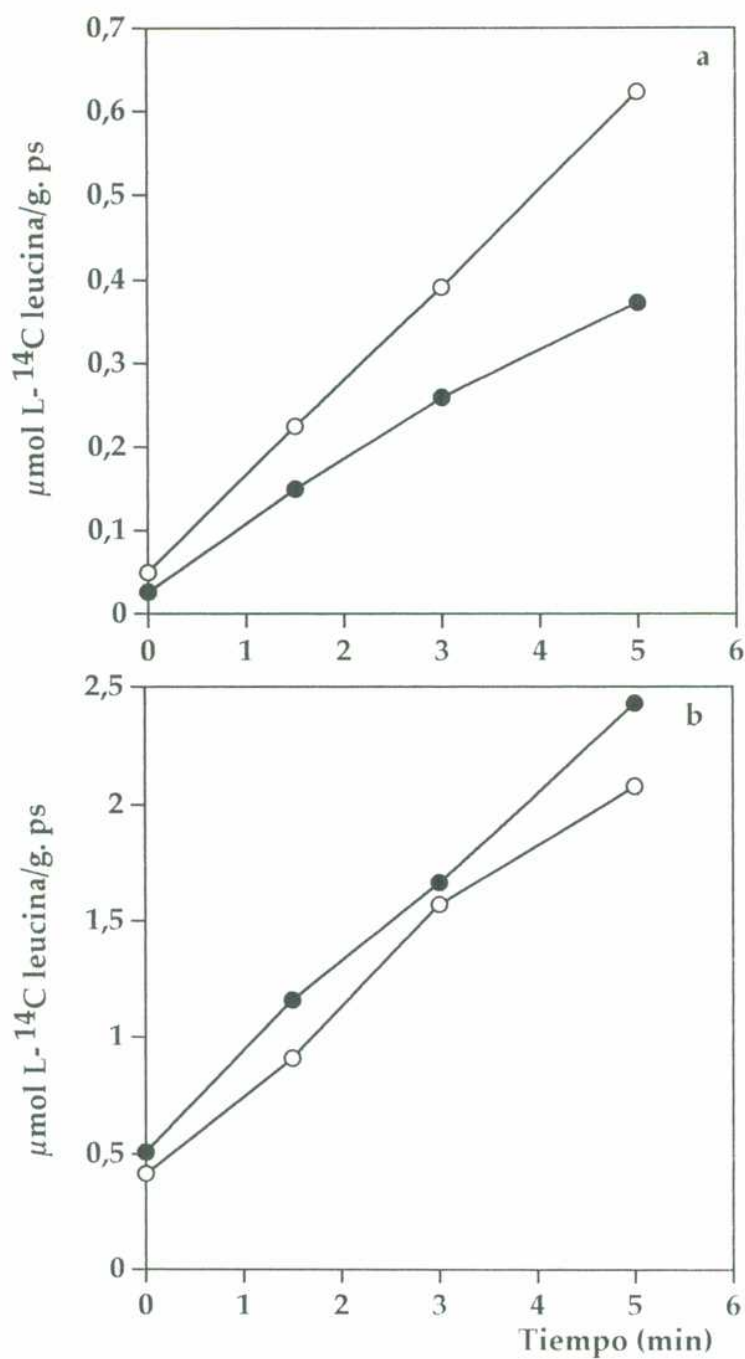


Figura 5.2. Incorporación de L- ^{14}C leucina en las cepas MMY2 y MMY2/H3 crecidas en medio VJNH_4^+ .

La incorporación de L-leucina se midió en células de las cepas MMY2 (●) y MMY2/H3 (○). Las concentraciones de L-leucina externa fueron 0,05mM (a) y 1,0mM (b).

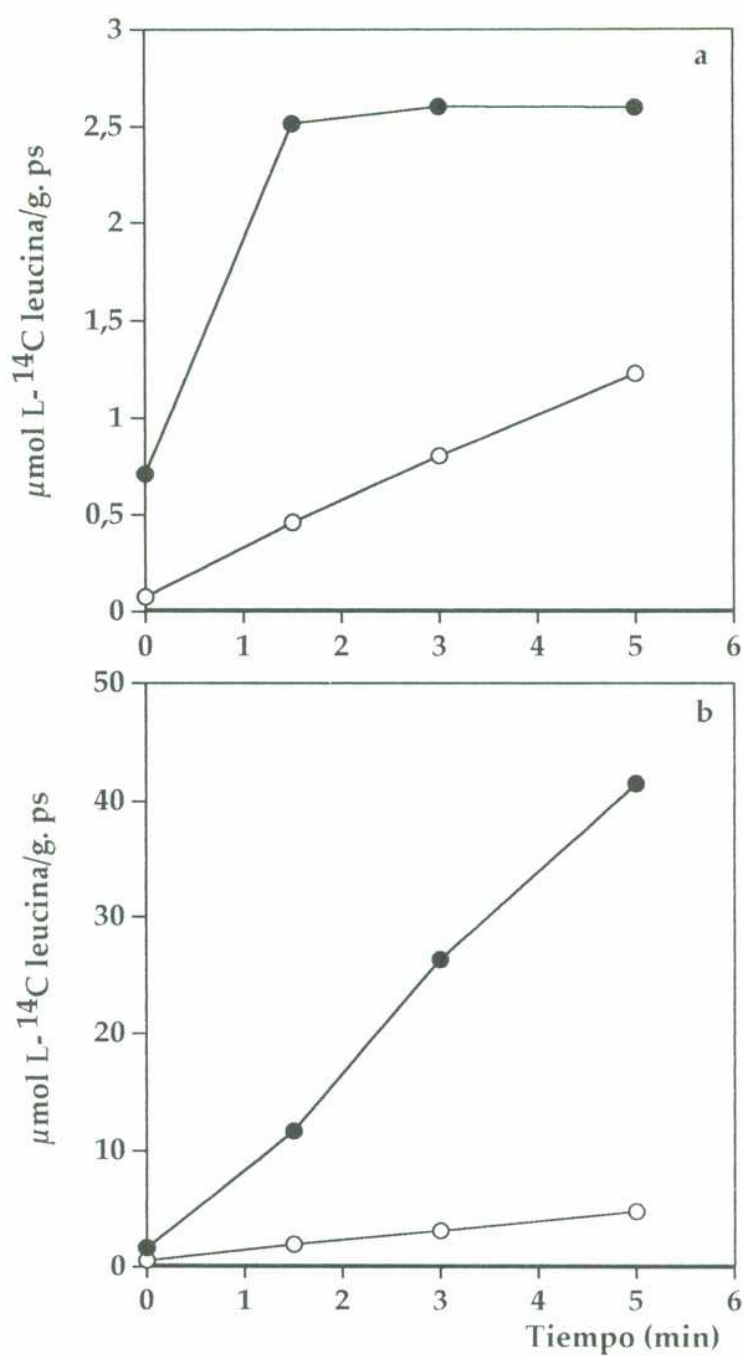


Figura 5.3. Incorporación de L-¹⁴C leucina en las cepas MMY2 y MMY2/H3 crecidas en medio VJPro.

La incorporación de L-leucina se midió en células de las cepas MMY2 (●) y MMY2/H3 (○). Las concentraciones de L-leucina externa fueron 0,05mM (a) y 1,0mM (b).

Tabla 5.1. Concentración intracelular de protones.

Cepas	medios de cultivo	pHi
	YPD	
MMY2		6,19
MMY2/H3		6,14
	VJNH ₄ ⁺	
MMY2		6,10
MMY2/H3		6,18
	VJPro	
MMY2		6,28
MMY2/H3		6,20

5.3. Parámetros cinéticos de los sistemas transportadores.

En la Tabla 5.2 se muestran los valores de los parámetros cinéticos para L-leucina en la cepa MMY2. Se pueden caracterizar cinéticamente dos sistemas de transporte en células crecidas en los medios YPD, YPD 0,3% y VJNH₄⁺, con afinidades en el orden de las previamente descritas para los sistemas S1 y S2.

En células crecidas en medio YPD 0,3% se observa que el sistema de mayor afinidad exhibe una capacidad dos veces mayor que en las células crecidas en medio YPD, resultado que concuerda con la relación c_i/c_e observada a la concentración externa de L-leucina 0,05 mM. El mismo resultado se obtiene para el sistema de baja afinidad, a la concentración externa de L-leucina 1,0 mM, con un valor aproximado a la unidad.

En células crecidas en medio $VJNH_4^+$ se observa una disminución de las capacidades de ambos sistemas para L-leucina con respecto a los medios complejos, sin cambios en las afinidades de ambos sistemas, lo que indica que las actividades de los sistemas son sensibles a los iones amonio presentes en el medio de cultivo.

En medio mínimo VJPro se puede caracterizar cinéticamente un único sistema de alta capacidad, diferente a los sistemas ya descritos presentes en medios complejos y $VJNH_4^+$, como se observa en la Figura 5.4.

Tabla 5.2. Parámetros cinéticos para L-leucina en la cepa MMY2.

medios de cultivo	sistema	K_T	$J_{máx}$
YPD	S1	0,07	0,53
	S2	0,55	1,92
YPD 0,3%	S1	0,06	1,04
	S2	0,30	2,42
$VJNH_4^+$	S1	0,05	0,30
	S2	0,26	0,58
VJPro	S	0,23	10,30

Los valores se calcularon por el método de análisis de Eadie-Hofstee según las representaciones de la Figura 5.4. K_T en mM y $J_{máx}$ en $\mu\text{mol/g}\cdot\text{min}$.

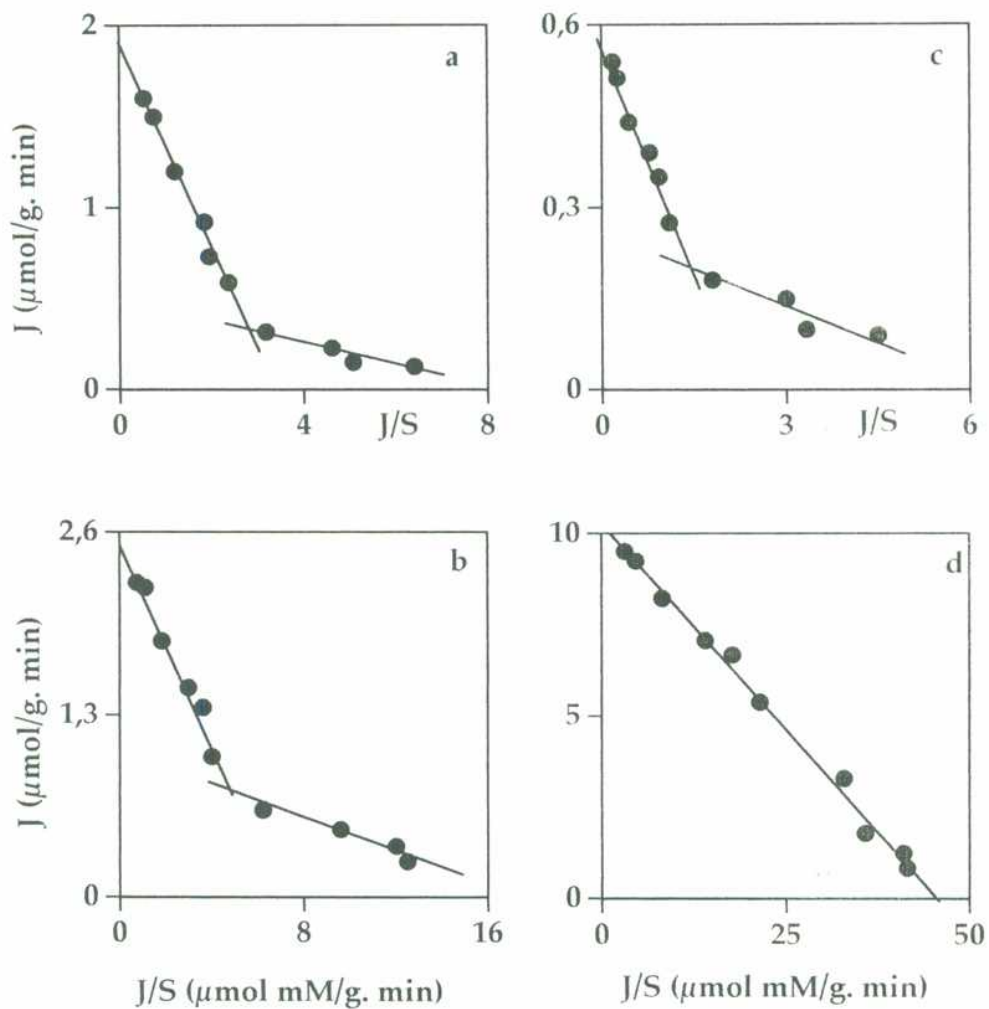


Figura 5.4. Cinética de entrada de L-leucina en la cepa MMY2 crecida en medio YPD (a), YPD 0,3% (b), VJNH₄⁺ (c) y VJPro (d). Representaciones de Eadie-Hofstee.

En la cepa MMY2/H3 crecida tanto en medio VJNH₄⁺ como en medio VJPro se caracterizan cinéticamente dos sistemas de transporte para L-leucina como se observa en la Figura 5.5.

Este resultado es diferente del observado en la cepa MMY2 crecida en medio VJPro donde se caracterizó cinéticamente un único sistema de transporte. Teniendo en cuenta estos resultados se decidió estudiar la cinética de inhibición del transporte de L-¹⁴C leucina por L-citrulina, como se muestra en la Figura 5.6. La observación de dos componentes caracterizados cinéticamente constituye una evidencia que en medio VJPro opere más de un sistema en el transporte de L-leucina. Uno de estos componentes es la GAP1 ya que la inhibición es competitiva con un $K_i = 0,08$ mM.

Esto constituye una evidencia, que en estas condiciones operan múltiples sistemas simultáneamente.

Tabla 5.3. Parámetros cinéticos para L-leucina en la cepa MMY2/H3.

medios de cultivo	K_T1	$J_{máx1}$	K_T2	$J_{máx2}$
VJNH ₄ ⁺	0,07	0,30	0,30	0,49
VJPro	0,05	0,60	0,42	1,88

Los valores se calcularon por el método de análisis de Eadie-Hofstee, según las representaciones de la Figura 5.5. K_T en mM y $J_{máx}$ en $\mu\text{mol} / \text{g} \cdot \text{min}$.

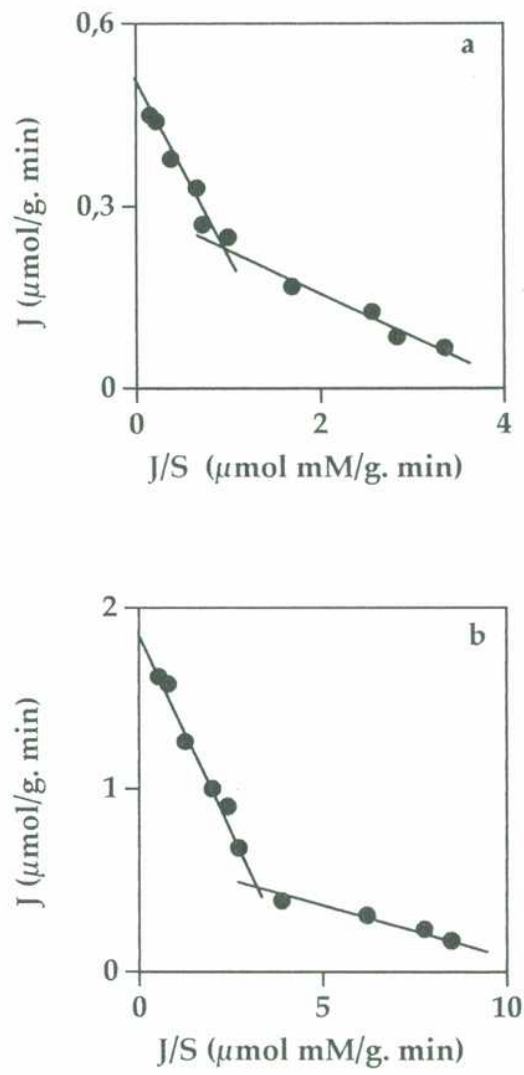


Figura 5.5. Cinética de entrada de L-leucina en la cepa MMY2/H3 crecida en medio VJNH₄⁺ (a) y VJPro (b). Representaciones de Eadie-Hofstee.

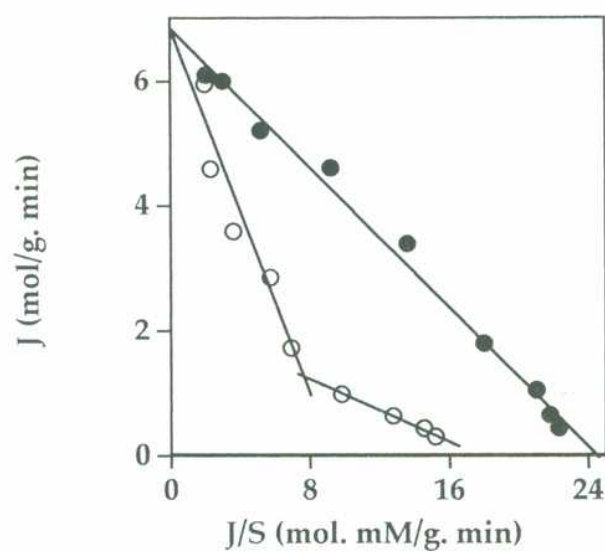


Figura 5.6. Cinética de entrada de L-¹⁴C leucina en la cepa MMY2 crecida en medio VJPro.

La entrada de L-leucina se determinó en ausencia (●) o presencia (○) de L-citrulina 0,1 mM. Representación de Eadie-Hofstee.

5.4. Efecto de L-aminoácidos sobre la entrada de L-¹⁴C leucina.

Con el fin de conocer la participación de los tres sistemas que transportan L-leucina en las condiciones experimentales descritas en materiales y métodos se determinó la entrada de L-¹⁴C leucina en presencia de concentraciones externas diez veces mayores de L-leucina, L-citrulina y L-prolina en las células crecidas en los diferentes medios de cultivo empleados.

En la Tabla 5.4 se observan los resultados obtenidos en las cepas MMY2 y MMY2/H3. Los mayores porcentajes de inhibición son producidos por L-leucina con un 70 a 90%, L-prolina no inhibe el transporte de L-leucina en ambas cepas en ninguno de los dos medios empleados.

En medio VJPro, sólo en la cepa MMY2, L-citrulina inhibe significativamente un 60% como era de esperarse en una cepa con actividad de GAP1.

Es llamativo encontrar un 20% de inhibición en células de la cepa MMY2 crecidas en medio VJNII₄⁺ en condiciones de represión de la GAP1.

Tabla 5.4. Ensayos de inhibición.

Inhibidor	medio de cultivo	[L-leucina]ext=0,05mM		[L-leucina]ext=1,0mM	
		MMY2	MMY2/H3	MMY2	MMY2/H3
VJNH ₄ ⁺					
control		0,263	0,391	1,665	1,600
L-leucina		0,076 (71)	0,147 (62)	0,328 (80)	0,309 (81)
L-citrulina		0,214 (19)	0,382 (2)	1,320 (21)	1,442 (10)
L-prolina		0,256 (3)	0,371 (5)	1,571 (6)	1,496 (7)
VJPro					
control		2,601	0,805	26,365	3,163
L-leucina		0,356 (86)	0,091 (89)	2,294 (91)	0,117 (96)
L-citrulina		1,139 (56)	0,458 (6)	11,231 (57)	2,916 (8)
L-prolina		2,504 (4)	0,793 (2)	24,835 (6)	3,011 (5)

Valores controles en μ moles de L-¹⁴C leucina/g.ps cél a t=3min. Entre paréntesis porciento de inhibición.

5.5. Incorporación de L-¹⁴C citrulina.

Para investigar la participación de la GAP1 se decidió estudiar la incorporación de L-¹⁴C citrulina 0,05 mM en las cepas MMY2 y MMY2/H3 crecidas en medios mínimos. Los gráficos de incorporación del aminoácido se observan en la Figura 5.7.

En células crecidas en medio VJPro, en condiciones de desrepresión de la GAP1, se produce una rápida saturación en la entrada de L-¹⁴C citrulina en la cepa silvestre, con una velocidad inicial de transporte de 3,60 $\mu\text{mol/g. min}$, y en la cepa *gap1*, la incorporación es lineal, con una velocidad inicial de 0,01 $\mu\text{mol/g. min}$. En medio VJNH₄⁺ la incorporación es lineal y las velocidades iniciales de transporte son de 0,03 y 0,002 mol/g. min. para las cepas MMY2 y MMY2/H3 respectivamente.

Además se realizó el cálculo de los parámetros cinéticos para L-citrulina en la cepa MMY2 crecida en medio mínimo VJPro. En la Figura 5.8 se muestra la representación de Eadie-Hofstee, donde se puede caracterizar un único sistema de transporte de alta afinidad y alta capacidad; en la Tabla 5.5 se presentan los parámetros cinéticos obtenidos.

Tabla 5.5. Parámetros cinéticos para L-citrulina en la cepa MMY2.

medio de cultivo	K _T	J _{máx}
VJPro	0,07	7,92

Los valores se calcularon por el método de análisis de Eadie-Hofstee según la representación de la Figura 5.8. K_T en mM y J_{máx} en $\mu\text{mol/g.min}$.

Los resultados expuestos en este capítulo concuerdan con el hecho de que en la cepa silvestre y en su mutante *gap1* crecidas en medio VJNH₄⁺, la GAP1 no participa en el transporte de L-leucina, observándose una represión de este sistema por iones amonio en el medio de cultivo.

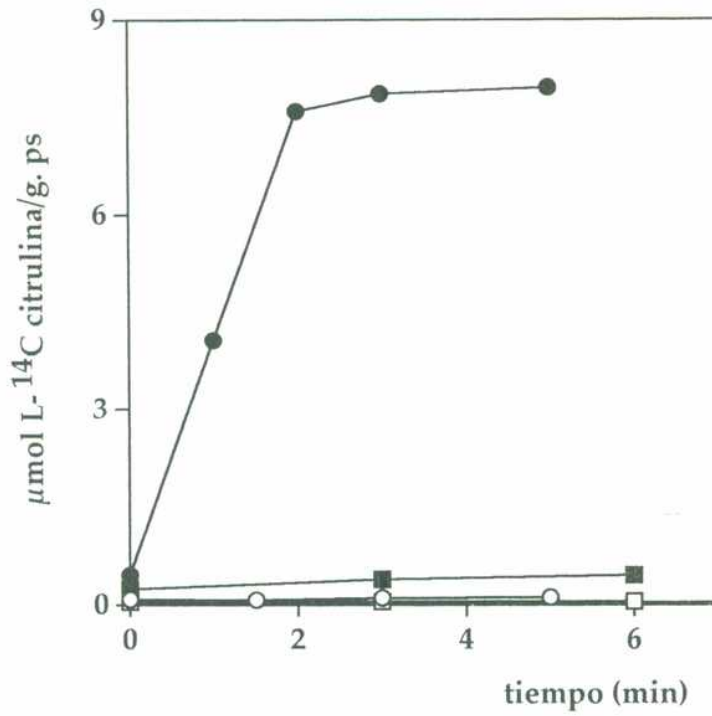


Figura 5.7. Incorporación de L-14C citrulina en las cepas MMY2 y MMY2/H3 crecidas en medio VJNH₄⁺ y VJPro.

La incorporación de L-citrulina se midió en células de las cepas MMY2 (●, ■) y MMY2/H3 (○, □) crecidas en medio VJNH₄⁺ (■, □) y VJPro (●, ○). La concentración de L-citrulina externa fue 0,05mM.

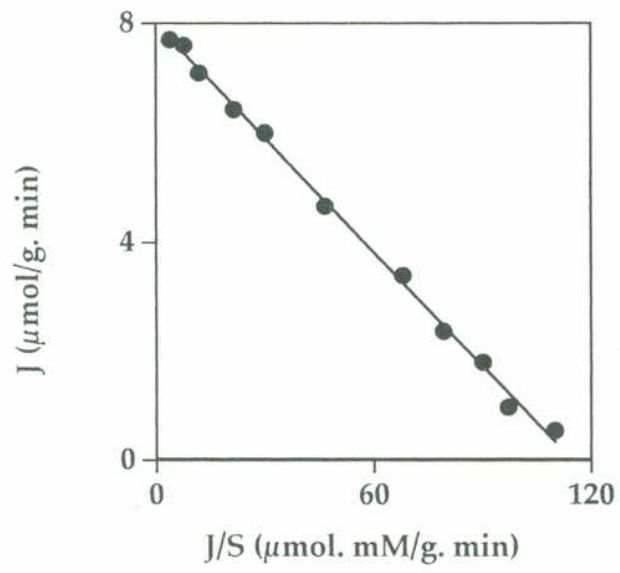


Figura 5.8. Cinética de entrada de L-citrulina en la cepa MMY2 crecida en medio VJPro. Representación de Eadie-Hofstee.

CAPITULO 6

ESTUDIO DEL PROCESO DE TRANSPORTE DE L-LEUCINA EN CELULAS TRANSFORMADAS MMY2 YCp50 Y MMY2 YCp50RAS2*val19*.

	página
6.1. Crecimiento celular en diferentes medios de cultivo.	81
6.2. Control celular.	82
6.3. Entrada e incorporación de L- ¹⁴ C leucina.	82
6.4. Determinación de la concentración intracelular de protones	89
6.5. Parámetros cinéticos de los sistemas transportadores.	90
6.6. Efecto de L-aminoácidos sobre la entrada de L- ¹⁴ C leucina.	91
6.7. Incorporación de L- ¹⁴ C citrulina.	98

ESTUDIO DEL PROCESO DE TRANSPORTE DE L-LEUCINA EN CELULAS TRANSFORMADAS MMY2 YCp50 Y MMY2 YCp50RAS2*val19*.

6.1. Crecimiento celular en diferentes medios de cultivo.

No se observan diferencias en los valores del tiempo de generación así como del tiempo en alcanzar la fase logarítmica tardía, entre las cepas MMY2 YCp50, MMY2 YCp50RAS2*val19* en cada uno de los medios empleados, como se indica en la Tabla 6.1.

Tabla 6.1. Crecimiento celular.

Cepas	medios de cultivo	G	τ
	YPD		
MMY2 YCp50		117	17
MMY2 YCp50RAS2 <i>val19</i>		121	17
	YPD 0,3%		
MMY2 YCp50		138	16
MMY2 YCp50RAS2 <i>val19</i>		141	16
	VJNH4+		
MMY2 YCp50		273	18
MMY2 YCp50RAS2 <i>val19</i>		279	18
	VJPro		
MMY2 YCp50		280	28
MMY2 YCp50RAS2 <i>val19</i>		318	28

Tiempo de generación G (min) y tiempo en que se alcanza la fase logarítmica tardía τ (horas).

6.2. Control celular

Se realizó periódicamente la tinción de carbohidratos totales, con solución de Lugol. La cepa MMY2 YCp50RAS2*val19* posee la menor concentración de carbohidratos totales que las células control. Esto se deduce de la intensidad de color después de estar las células 40-60 seg en contacto con el colorante, desarrollando color desde amarillo pardo (MMY2 YCp50RAS2*val19*) al marrón intenso (MMY2 YCp50); ver Figura 6.1.

6.3. Entrada e incorporación de L-¹⁴C leucina.

Los ensayos de entrada e incorporación de L-¹⁴C leucina se realizaron según materiales y métodos. Las células se crecieron en medios ricos YPD e YPD 0,3% y medios mínimos VJNH₄⁺ y VJPro.

En las cepas MMY2 YCp50 y MMY2 YCp50RAS2*val19* se observa que para ambas concentraciones externas de L-leucina empleadas los trazados de incorporación son lineales hasta $t_0+5\text{min}$; excepto para las células crecidas en medio VJPro a baja concentración de L-leucina externa donde se observa saturación a tiempos muy cortos, menores de 1,5 minutos, como se presentan en las Figuras 6.2, 6.3, 6.4 y 6.5.

En células crecidas en medio YPD ambas cepas transformadas presenta una relación de L-leucina c_i/c_e , para $t_0+3\text{min}$ igual a 7 a la menor concentración de L-leucina externa, igual a 1,5 para la cepa MMY2 YCp50 y para la cepa MMY2 YCp50RAS2*val19* el sistema no es concentrativo a la mayor concentración externa del aminoácido. En la Figura 6.2 se muestran los gráficos de entrada e incorporación de L-¹⁴C leucina, para ambas cepas transformadas crecidas en medio YPD.

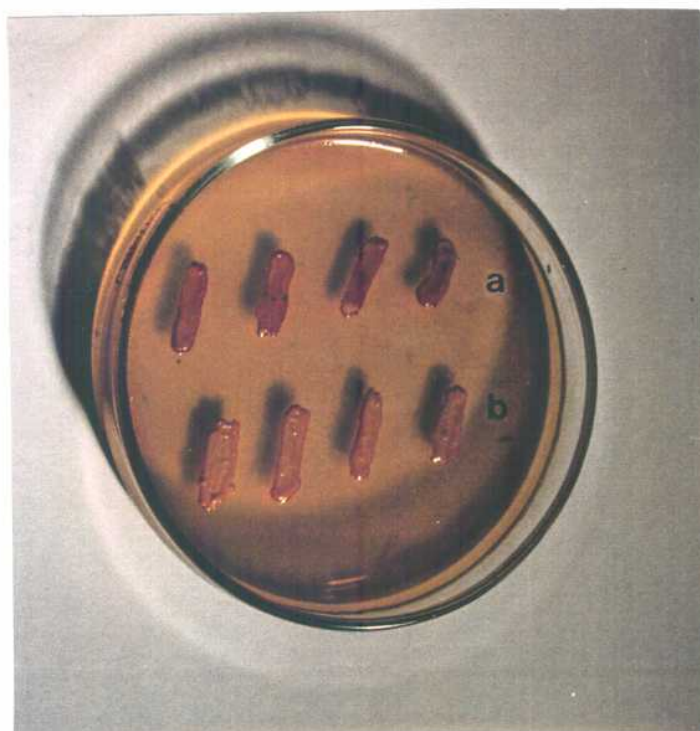


Figura 6.1. Tinción de carbohidratos totales.
Las células de las cepas MMY2 YCp50 (a) y MMY2 YCp50 *RAS2^{val19}* (b) crecieron en medio mínimo $VJNH_4^+$.

En medio YPD 0,3% el valor del cociente c_i/c_e es 12 y aproximadamente 3 a baja y alta concentración externa de L-leucina para ambas cepas respectivamente. En la Figura 6.3 se observan los gráficos de entrada para ambas cepas en ese medio de cultivo.

Comparando los valores de entrada de L-leucina a ambas concentraciones externas del aminoácido empleado, no se observan diferencias significativas entre ambas cepas transformadas crecidas en medio YPD e YPD 0,3%. Cuando se emplea 0,3% de glucosa en el medio de cultivo, se obtienen los mayores valores de velocidades iniciales de entrada de L-leucina.

Se presentan los gráficos de entrada, en medio mínimo $VJNH_4^+$, en la Figura 6.6. Se observa que la relación c_i/c_e para la cepa MMY2 YCp50 es 8 y para la cepa MMY2 YCp50RAS2*val19* es 19 para 0,05 mM de L-leucina externa; a 1,0 mM, el cociente es 2 y 4 para las cepas MMY2 YCp50 y MMY2 YCp50RAS2*val19*, respectivamente.

Según se observa en la Figura 6.5, en ambas cepas crecidas en medio mínimo VJPro, la entrada de L- ^{14}C leucina a baja concentración externa presenta una rápida saturación y concentra 24 veces el aminoácido. A alta concentración externa del aminoácido, ambas cepas transformadas concentran aproximadamente 28 veces el aminoácido y la incorporación es lineal hasta $t_0+3\text{min}$.

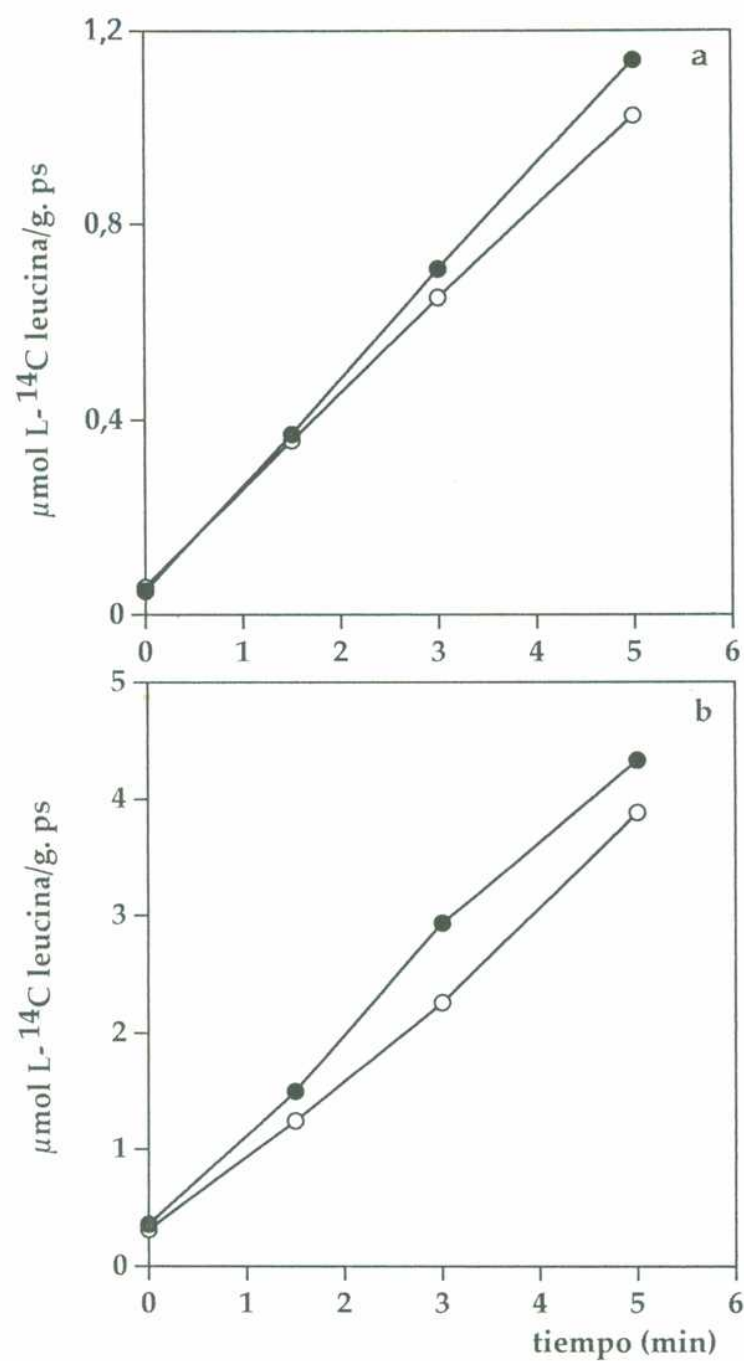


Figura 6.2. Incorporación de L-¹⁴C leucina en las cepas MMY2 YCp50 y MMY2 YCp50 *RAS2val19* crecidas en medio YPD.

La incorporación de L-leucina se midió en células de las cepas MMY2 YCp50 (●) y MMY2 YCp50 *RAS2val19* (○). Las concentraciones de L-leucina externa fueron 0,05mM (a) y 1,0mM (b).

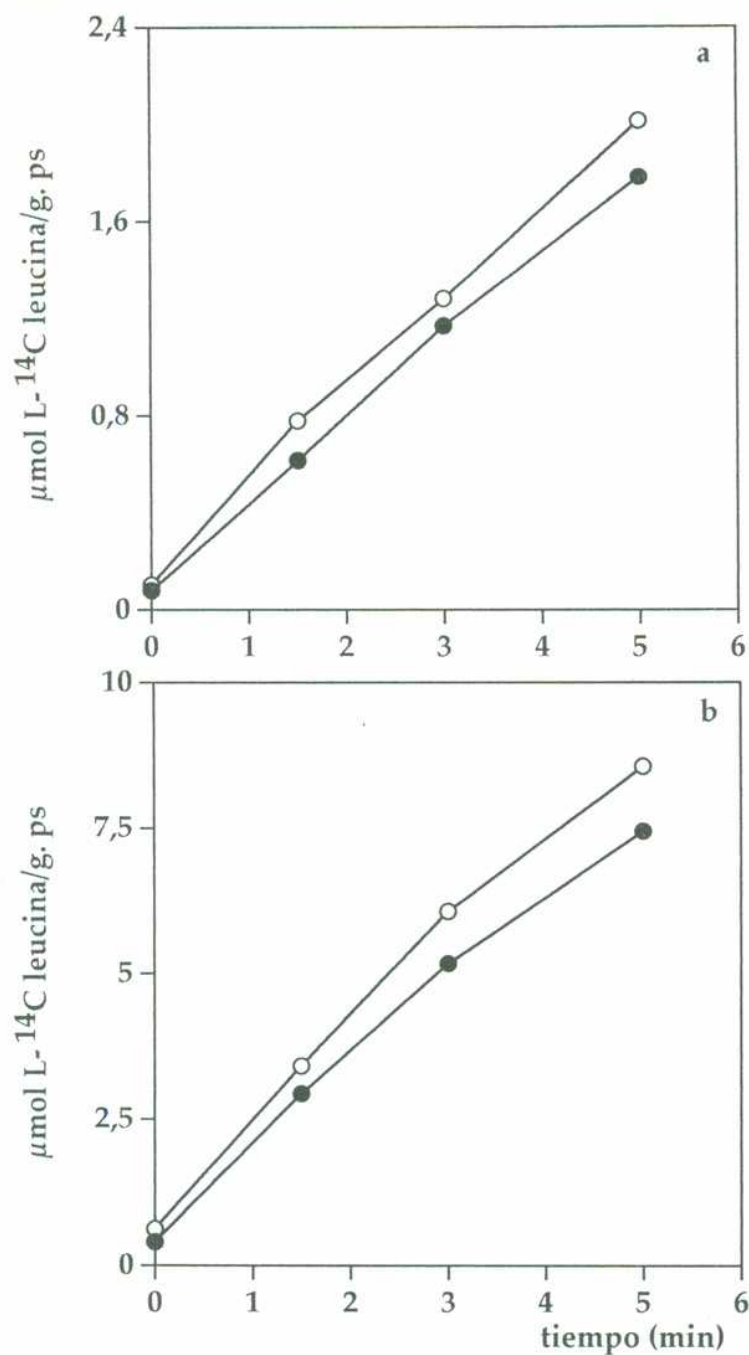


Figura 6.3. Incorporación de L- ^{14}C leucina en las cepas MMY2 YCp50 y MMY2 YCp50 *RAS2val19* crecidas en medio YPD 0,3%.

La incorporación de L-leucina se midió en células de las cepas MMY2 YCp50 (●) y MMY2 YCp50 *RAS2val19* (○). Las concentraciones de L-leucina externa fueron 0,05mM (a) y 1,0mM (b).

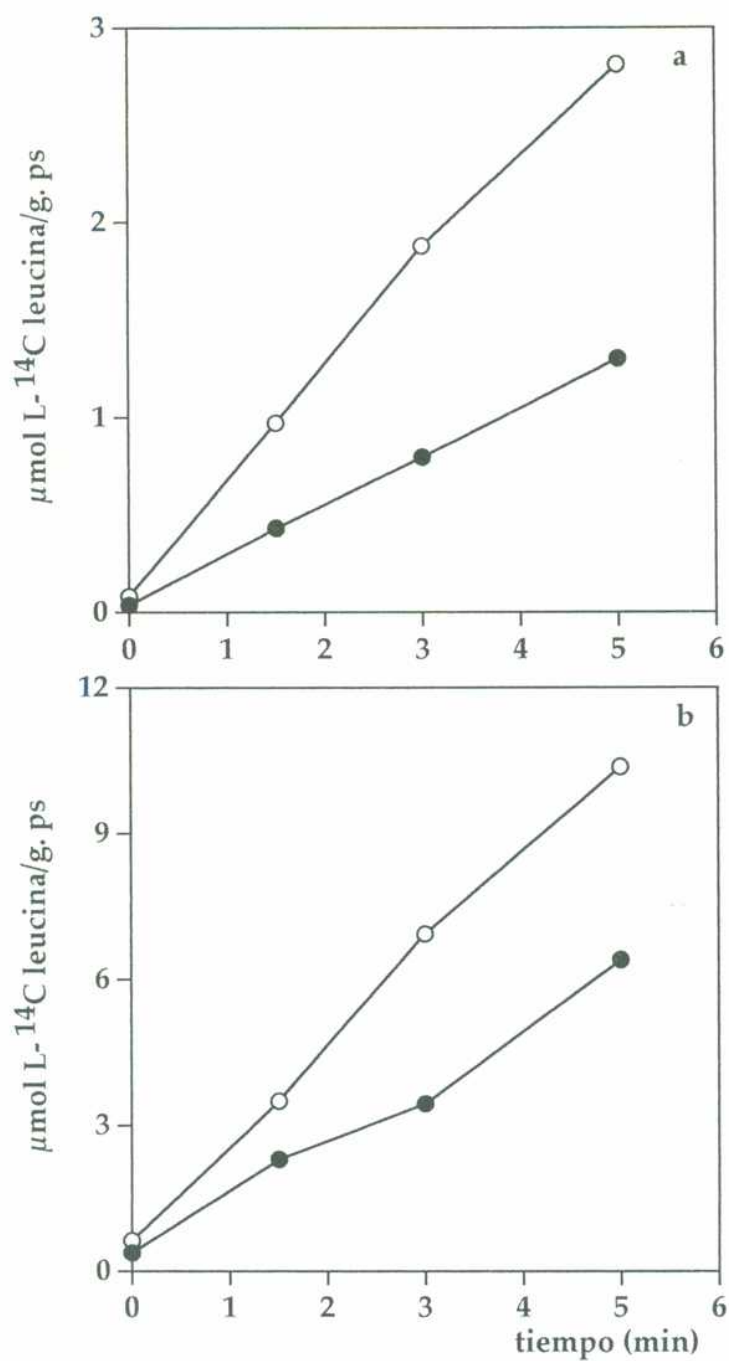


Figura 6.4. Incorporación de L- ^{14}C leucina en las cepas MMY2 YCp50 y MMY2 YCp50 *RAS2val19* crecidas en medio VJNH4+.

La incorporación de L-leucina se midió en células de las cepas MMY2 YCp50 (●) y MMY2 YCp50 *RAS2val19* (O). Las concentraciones de L-leucina externa fueron 0,05mM (a) y 1,0mM (b).

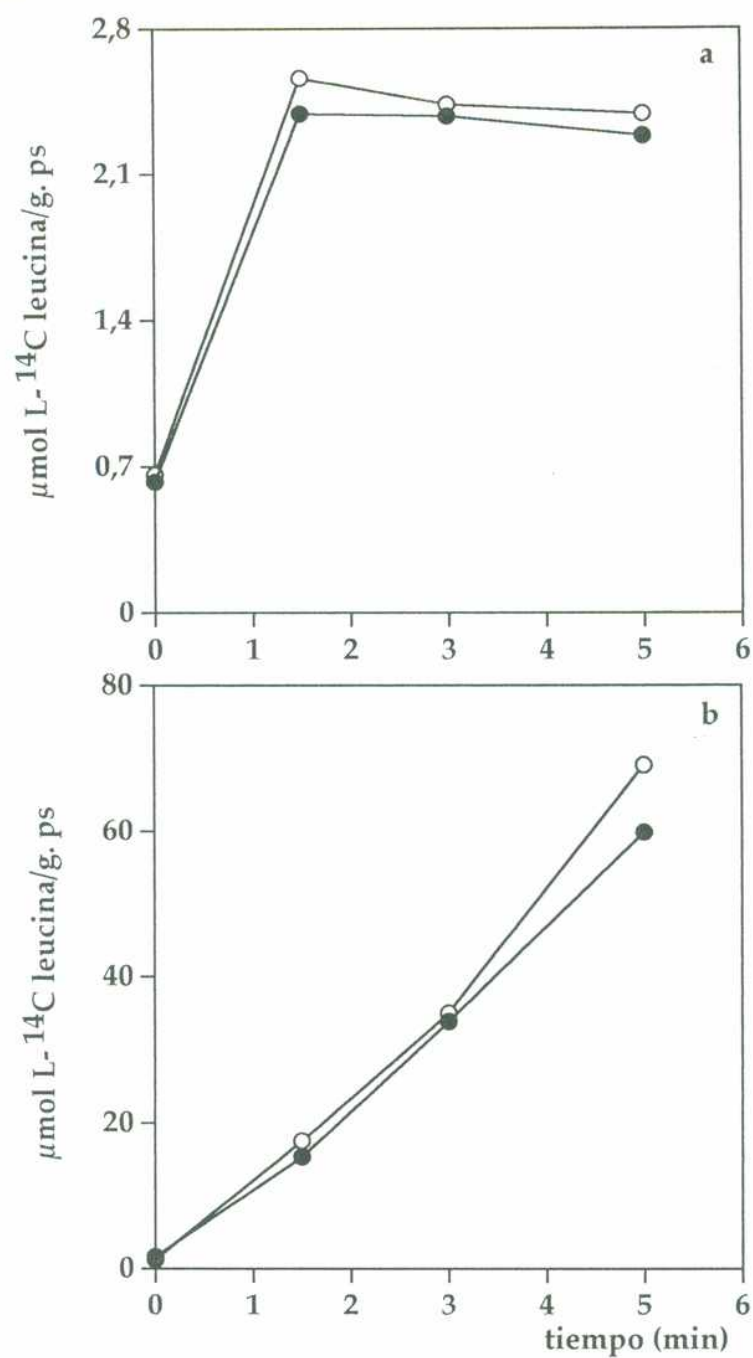


Figura 6.5. Incorporación de L-¹⁴C leucina en las cepas MMY2 YCp50 y MMY2 YCp50 *RAS2val19* crecidas en medio VJPro.

La incorporación de L-leucina se midió en células de las cepas MMY2 YCp50 (●) y MMY2 YCp50 *RAS2val19* (○). Las concentraciones de L-leucina externa fueron 0,05mM (a) y 1,0mM (b).

6.6. Determinación de la concentración intracelular de protones.

Los valores obtenidos, en el cálculo de pH interno (pHi), se mantienen constantes entre los 3 y 10 minutos de incubación. En la Tabla 6.2 se muestran los promedios de los valores obtenidos en las cepas transformadas crecidas en los diferentes medios de cultivos. No se ha podido encontrar una relación entre el pHi y la actividad de transporte de L-¹⁴C leucina.

Tabla 6.2. Concentración intracelular de protones.

Cepas	medios de cultivo	pHi
	YPD	
MMY2 YCp50		6,22
MMY2 YCp50 RAS2 val19		6,12
	VJNH ₄ ⁺	
MMY2 YCp50		6,18
MMY2 YCp50RAS2 val19		6,17
	VJPro	
MMY2 YCp50		6,37
MMY2 YCp50RAS2 val19		6,48

6.5. Parámetros cinéticos de los sistemas transportadores.

Es de interés caracterizar cinéticamente los sistemas de transporte de L-leucina presentes en los distintos medios de cultivo utilizados, con el fin de indagar la participación de los mismos en diferentes condiciones metabólicas.

En las Figuras 6.6, 6.7 y 6.8 se muestran las representaciones de Eadie-Hofstee de la cinética de transporte de L-leucina en ambas cepas crecidas en medios YPD, YPD 0,3% y VJNH₄⁺ respectivamente. En la Tabla 6.3 se presentan los valores de los parámetros cinéticos obtenidos por el método de análisis de Eadie-Hofstee.

En ambas cepas transformadas el análisis cinético demuestra la existencia de dos sistemas de transporte para L-leucina: uno de alta afinidad y baja capacidad y otro de baja afinidad y alta capacidad. Los valores obtenidos son del mismo orden que los encontrados en la cepa MMY2. No se observan diferencias en los valores de afinidades y de capacidades, entre ambas cepas, en células crecidas en medios ricos. Por el contrario, en la cepa MMY2 YCp50RAS2*val19* crecida en medio VJNH₄⁺ el sistema S1 duplica su capacidad de transporte.

En medio VJPro es posible caracterizar cinéticamente, en ambas cepas transformadas, un sólo sistema de transporte para L-leucina, de muy alta capacidad, como se observa en la Figura 6.9. Este resultado es similar al ya descrito en la cepa MMY2 crecida en medio VJPro. Sólo se observan diferencias entre ambas cepas en las capacidades, siendo algo mayor en la cepa MMY2 YCp50RAS2*val19*.

Tabla 6.3. Parámetros cinéticos para L-leucina.

medios de cultivo	sistema	MMY2 YCp50		MMY2 YCp50RAS2 <i>val19</i>	
		K _T	J _{máx}	K _T	J _{máx}
YPD	S1	0,05	0,45	0,06	0,50
	S2	0,26	1,08	0,27	0,82
YPD 0,3%	S1	0,10	1,17	0,09	1,14
	S2	0,48	2,35	0,55	2,66
VJNH ₄ ⁺	S1	0,05	0,76	0,08	1,79
	S2	0,25	1,92	0,19	2,28
VJPro	S	0,27	14,00	0,35	19,13

Los valores se calcularon por el método de análisis de Eadie-Hofstee según las representaciones de las Figuras 6.6 a 6.9. K_T en mM y J_{máx} en $\mu\text{mol/g}\cdot\text{min}$.

6.6. Efecto de L-aminoácidos sobre la entrada de L-¹⁴C leucina.

Las Tablas 6.4 y 6.5 presentan los valores de entrada de L-¹⁴C leucina obtenidos en presencia de diferentes L-aminoácidos y los correspondientes porcentajes de inhibición.

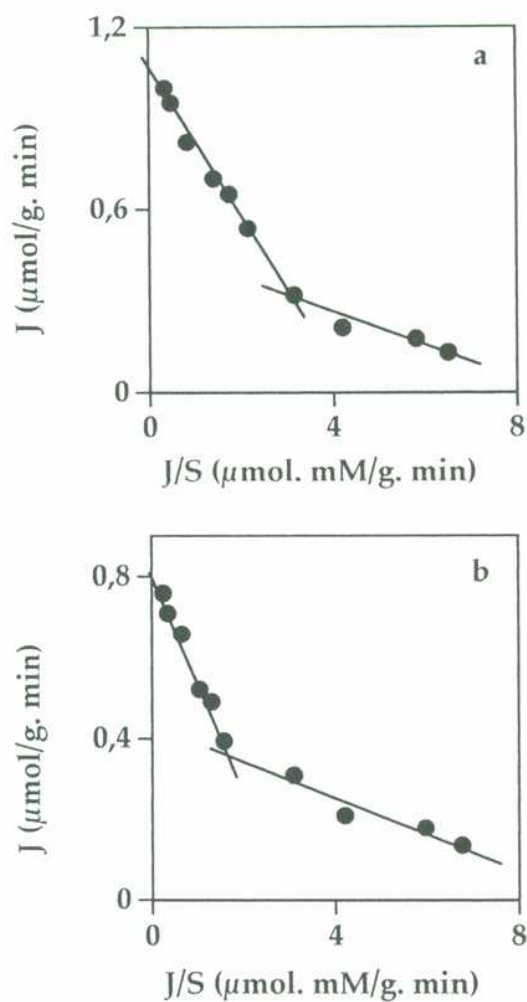


Figura 6.6. Cinética de entrada de L-leucina en las cepas MMY2 YCp50 (a) y MMY2 YCp50RAS2val19 (b) crecidas en medio YPD. Representaciones de Eadie-Hofstee.

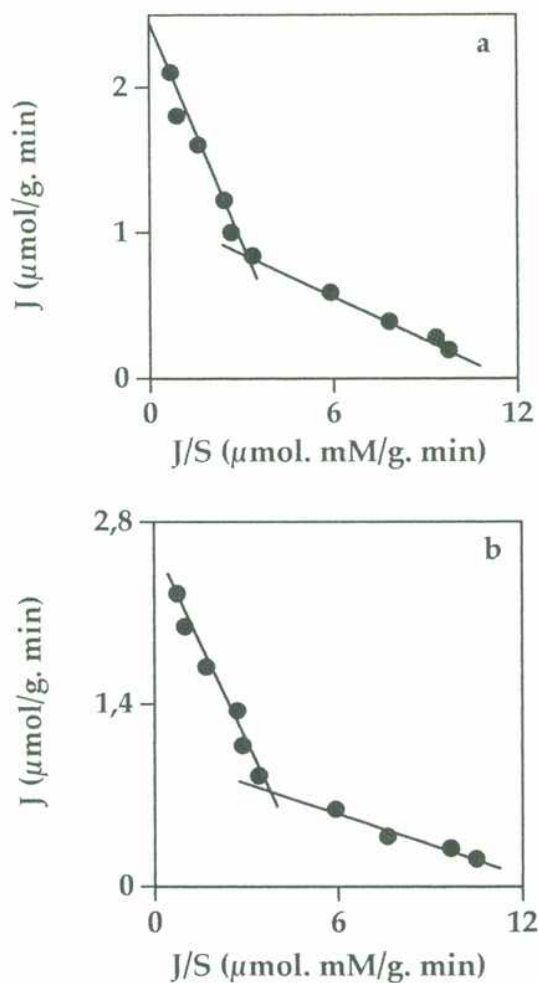


Figura 6.7. Cinética de entrada de L-leucina en las cepas MMY2 YCp50 (a) y MMY2 YCp50RAS2val19 (b) crecidas en medio YPD 0,3%. Representaciones de Eadie-Hofstee.

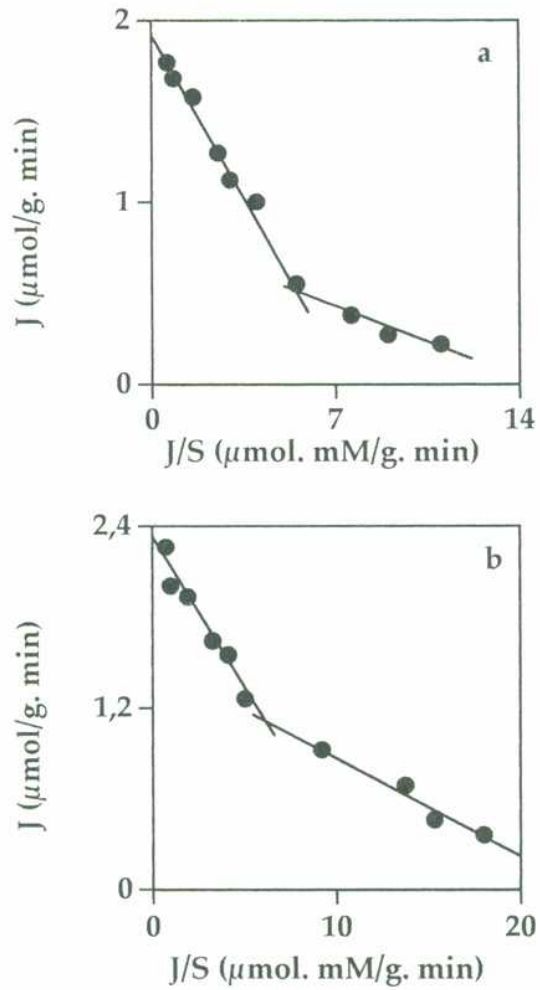


Figura 6.8. Cinética de entrada de L-leucina en las cepas MMY2 YCp50 (a) y MMY2 YCp50RAS2val19 (b) crecidas en medio VJNH₄⁺. Representaciones de Eadie-Hofstee.

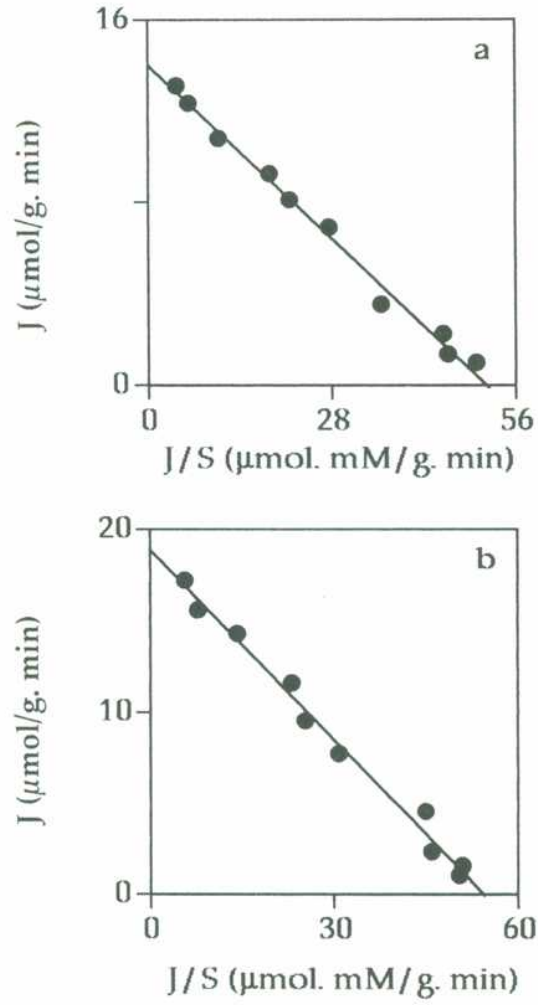


Figura 6.9. Cinética de entrada de L-leucina en las cepas MMY2 YCp50 (a) y MMY2 YCp50RAS2val19 (b) crecidas en medio VJPro. Representaciones de Eadie-Hofstee.

Tabla 6.4. Ensayos de inhibición.

inhibidor	medio de cultivo	[L-leucina]ext=0,05mM		[L-leucina]ext=1,0mM	
		MMY2 YCP50	MMY2 YCP50 <i>RAS2^{ts119}</i>	MMY2 YCP50	MMY2 YCP50 <i>RAS2^{ts119}</i>
YPD					
control		0,708	0,651	2,937	2,262
L-leucina		0,270 (62)	0,206 (68)	0,576 (80)	0,423 (81)
L-citrulina		0,716 (0)	0,644 (1)	2,996 (0)	2,220 (2)
L-prolina		0,657 (7)	0,594 (8)	2,796 (5)	0,318 (0)
YPD 0,3%					
control		1,169	1,282	5,177	6,077
L-leucina		0,276 (76)	0,409 (68)	1,077 (79)	1,129 (81)
L-citrulina		1,061 (9)	1,247 (3)	4,799 (7)	5,846 (4)
L-prolina		1,101 (6)	1,145 (11)	4,742 (8)	6,231 (0)

Valores controles en μ moles de L-¹⁴C leucina/g.ps cél a t=3min. Entre paréntesis, porciento de inhibición.

Tabla 6.5. Ensayos de inhibición.

Inhibición	medio de cultivo	[L-leucina]ext=0,05mM		[L-leucina]ext=1,0mM	
		MMY2 YCP50	MMY2 YCP50 <i>RAS2^{ul19}</i>	MMY2 YCP50	MMY2 YCP50 <i>RAS2^{ul19}</i>
VJNH ₄ ⁺					
control		0,793	1,877	3,948	6,935
L-leucina		0,167 (79)	0,387 (79)	0,734 (81)	1,165 (83)
L-citrulina		0,671 (15)	1,571 (16)	3,506 (11)	5,943 (14)
L-prolina		0,756 (5)	1,729 (8)	3,605 (9)	6,789 (2)
VJPro					
control		2,378	2,434	33,955	35,076
L-leucina		0,350 (85)	0,406 (83)	3,599 (89)	7,050 (80)
L-citrulina		0,830 (65)	0,828 (66)	16,977 (50)	16,731 (52)
L-prolina		2,215 (7)	2,195 (10)	32,325 (5)	31,375 (11)

Valores controles en μ moles de L-¹⁴C leucina/g.ps cél a t=3min. Entre paréntesis, porciento de inhibición.

Los valores obtenidos en los ensayos del efecto de L-leucina, L-citrulina y L-prolina sobre la entrada de L- ^{14}C leucina en las cepas transformadas MMY2 YCp50 y MMY2 YCp50*RAS2val19* son concordantes, sin cambios apreciables, con los obtenidos en la cepa MMY2 en las mismas condiciones metabólicas, presentados en el capítulo anterior.

6.7. Incorporación de L- ^{14}C citrulina.

Considerando que en medio mínimo con L-prolina como fuente de nitrógeno, es decir en condiciones de desrepresión de la permeasa general de aminoácidos, estaría presente más de un sistema de transporte de L-leucina, se decidió realizar el estudio de la actividad de la GAP1, utilizando L- ^{14}C citrulina como sustrato.

En la Figura 6.10 se observan los resultados obtenidos en los experimentos de entrada e incorporación de L- ^{14}C citrulina, que se realizan en células crecidas en medios mínimos VJNH $_4^+$ y VJPro. En células crecidas en medio VJPro se produce una rápida saturación en la entrada de L-citrulina en la cepa MMY2 YCp50*RAS2val19*, con una menor incorporación del aminoácido.

En la Tabla 6.6 se muestran los valores de velocidades iniciales de entrada de L- ^{14}C citrulina para las dos cepas transformadas crecidas en medios VJPro, VJNH $_4^+$ y la relación $v_{\text{Pro}}/v_{\text{NH}_4^+}$ a concentración 0,05 mM del aminoácido radiactivo.

La relación $v_{\text{Pro}}/v_{\text{NH}_4^+}$ es de 180 para la cepa MMY2 YCp50 y 255 para la cepa MMY2 YCp50*RAS2val19*.

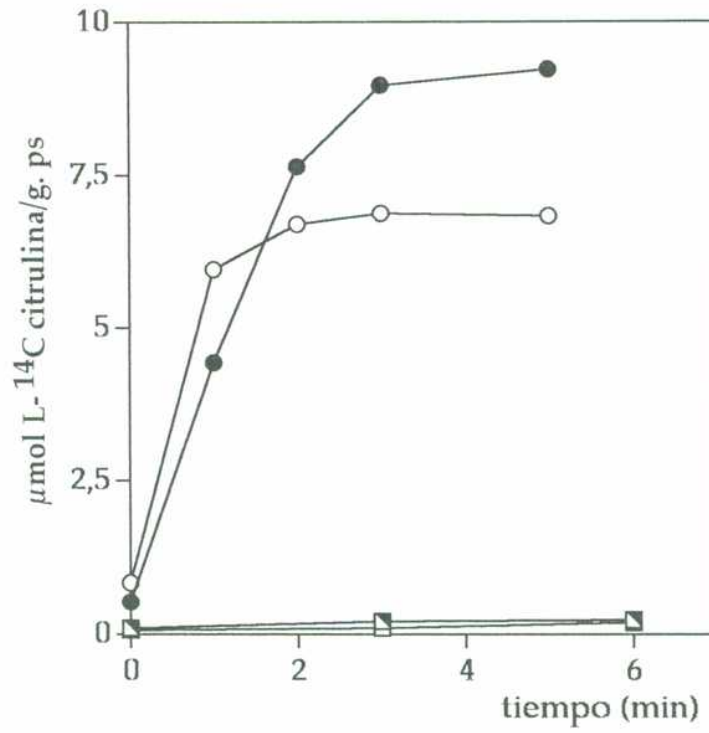


Figura 6.10. Incorporación de L-¹⁴C citrulina en las cepas MMY2 YCp50 y MMY2 YCp50RAS2val19 crecidas en medio VJNH₄⁺ y VJPro. La incorporación de L-citrulina se midió en células de las cepas MMY2 YCp50 (●, ■) y MMY2 YCp50RAS2val19 (○, □) crecidas en medio VJNH₄⁺ (■, □) y VJPro (●, ○). La concentración de L-citrulina externa fue 0,05mM.

Tabla 6.6. Relación de los valores de velocidades iniciales de entrada de L-citrulina en medios $VJNH_4^+$ y $VJPro$.

Cepas	[L-citrulina] _{ext} =0,05mM		
	$VJNH_4^+$	$VJPro$	$viPro/viNH_4^+$
MMY2 YCp50	0,02	3,6	180
MMY2 YCp50 <i>RAS2val19</i>	0,02	5,1	255

Velocidades iniciales de entrada en μ moles de L- ^{14}C citrulina/g.min.

En la Figura 6.11 se muestra las representaciones de Eadie-Hofstee para las dos cepas crecidas en medio $VJPro$ por el cual puede caracterizarse un sólo sistema transportador para L- ^{14}C citrulina.

En la Tabla 6.7 se muestran los valores de los parámetros cinéticos obtenidos por análisis de datos de Eadie-Hofstee; no se observan diferencias en las afinidades ni en las capacidades del sistema general de aminoácidos en las cepas MMY2 transformadas.

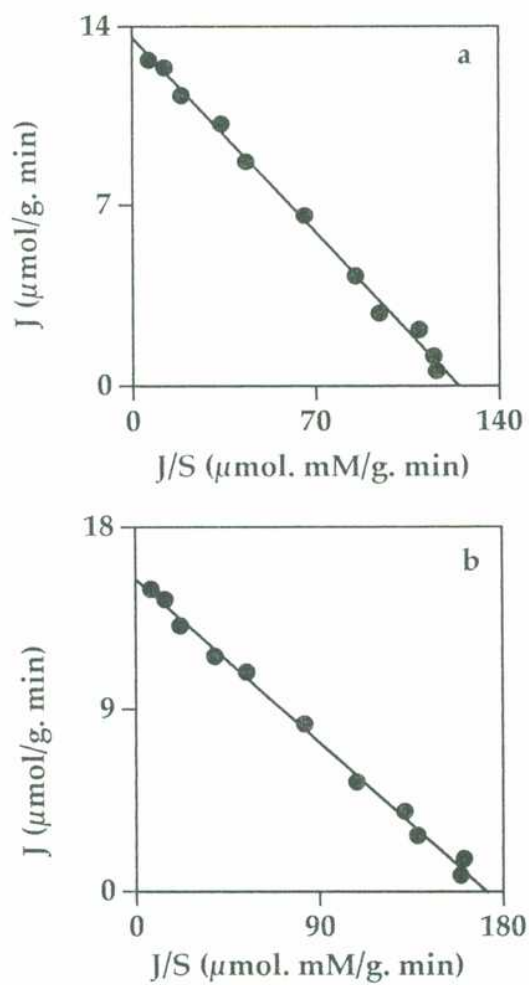


Figura 6.11. Cinética de entrada de L-citrulina en las cepas MMY2 YCp50 (a) y MMY2 YCp50RAS2val19 (b) crecidas en medio VJPro. Representaciones de Eadie-Hofstee.

Tabla 6.7. Parámetros cinéticos para L-citrulina.

Cepas	K_T1	$J_{m\acute{a}x1}$
MMY2 YCp50	0,11	13,64
MMY2 YCp50RAS2val19	0,09	15,70

Los valores se calcularon por el método de análisis de Eadie-Hofstee según las representaciones de la Figura 6.11. K_T en mM y $J_{m\acute{a}x}$ en $\text{ol/g}\cdot\text{min}$.

CAPITULO 7

ESTUDIO DEL PROCESO DE TRANSPORTE DE L-LEUCINA EN CELULAS TRANSFORMADAS MMY2/H3 YCp50 Y MMY2/H3 YCp50RAS2*val19*.

	página
7.1. Obtención de las cepas MMY2/H3 transformadas.	103
7.2. Control celular.	103
7.3. Crecimiento celular en diferentes medios de cultivo.	105
7.4. Entrada e incorporación de L- ¹⁴ C leucina.	106
7.5. Determinación de la concentración intracelular de protones.	112
7.6. Parámetros cinéticos de los sistemas transportadores.	113
7.7. Efecto de L-aminoácidos sobre la entrada de L- ¹⁴ C leucina.	116
7.8. Incorporación de L- ¹⁴ C citrulina.	116

ESTUDIO DEL PROCESO DE TRANSPORTE DE L-LEUCINA EN CELULAS TRANSFORMADAS MMY2/H3 YCp50 Y MMY2/H3 YCp50RAS2*val19*.

7.1. Obtención de las cepas MMY2/H3 transformadas.

Las células MMY2/H3 transformadas con los plásmidos YCp50 e YCp50RAS2*val19* se obtuvieron por electroporación como se indicó en materiales y métodos. Con posterioridad, las colonias aisladas se repicaron repetidas veces en medio sintético VJNH₄⁺ y se realizaron los controles que se indican a continuación.

7.2. Control celular.

La tinción de carbohidratos totales se presenta en la Figura 7.1, se observa el color desarrollado con posterioridad a la adición de la solución colorante a la placa con las células crecidas en medio mínimo VJNH₄⁺ durante 48 horas a 30°C. El color más intenso desarrollado lo presenta la cepa MMY2/H3 YCp50, lo que indica que posee la mayor cantidad de carbohidratos totales.

Para verificar la presencia de la mutación *gap1* se realizan los ensayos de crecimiento que se resumen en la Tabla 7.1. Se utilizó como control positivo, con actividad de GAP1, la cepa MMY2 y las cepas *gap1* MMY2/H3 y 2512c como controles negativos.



Figura 7.1. Tinción de carbohidratos totales.
Las células de las cepas MMY2/H3 YCp50 (a) y MMY2/H3 YCp50
RAS2val19 (b) crecieron en medio mínimo $VJNH_4^+$.

Tabla 7.1, Crecimiento en medios de cultivo selectivos.

Cepas	medios de cultivos		
	VJPro	VJPro+D-his	VJCit
MMY2	+		++
MMY2/H3	+	+	
2512c	++	++	+
MMY2/H3 YCp50	++	+	
MMY2/H3 YCp50RAS2 <i>val19</i>	++	+	

Máximo crecimiento relativo (++), menor crecimiento relativo (+), no se observa crecimiento (-).

7.3. Crecimiento celular en diferentes medios de cultivo.

Como se expuso en el caso de las células transformadas de la cepa MMY2, para las transformadas de la cepa MMY2/H3 no se encuentran diferencias en los valores del tiempo de generación y en el tiempo en alcanzar la fase logarítmica tardía como se muestran en la Tabla 7.2.

Tabla 7.2. Crecimiento celular.

Cepas	medios de cultivo	G	τ
	YPD		
MMY2/H3 YCp50		172	17
MMY2/H3 YCp50RAS2 <i>val19</i>		118	17
	YPD 0,3%		
MMY2/H3 YCp50		114	16
MMY2/H3 YCp50RAS2 <i>val19</i>		114	16
	VJNH4+		
MMY2/H3 YCp50		212	18
MMY2/H3 YCp50RAS2 <i>val19</i>		281	18
	VJPro		
MMY2/H3 YCp50		314	28
MMY2/H3 YCp50RAS2 <i>val19</i>		345	28

Tiempo de generación G (min) y tiempo en que se alcanza la fase logarítmica tardía τ (horas).

7.4. Entrada e incorporación de L-¹⁴C leucina.

La entrada de L-¹⁴C leucina en las cepas MMY2/H3 YCp50 y MMY2/H3 YCp50RAS2*val19* se determinaron en células crecidas en los medios complejos YPD e YPD 0,3% y mínimos VJNH₄⁺ y VJPro, descritos en materiales y métodos.

La entrada e incorporación de L-¹⁴C leucina en las células crecidas en los medios de cultivos indicados presenta, tanto a baja como a alta concentración externa del aminoácido, trazados lineales y no se observa saturación en el transporte para ningún medio empleado hasta $t_0+5\text{min}$, como se presenta en las Figuras 7.2, 7.3, 7.4 y 7.5.

En las cepas MMY2/H3 YCp50 y MMY2/H3 YCp50*RAS2val19* crecidas en medio YPD el valor del cociente c_i/c_e para L-leucina a $t_0+3\text{min}$ es 16 y 18 a baja concentración respectivamente y 4 y 3 a alta concentración externa del aminoácido, respectivamente. En la Figura 7.2 se observan los gráficos de entrada para ambas cepas.

En medio YPD 0,3% la relación c_i/c_e para la cepa MMY2/H3 YCp50 es 39 y para la cepa MMY2/H3 YCp50*RAS2val19* es de 33 para 0,05 mM de L-leucina externa; a 1,0 mM el cociente es de 9 y 8 para ambas cepas, respectivamente. Se presentan los gráficos de entrada en las células crecidas en dicho medio de cultivo en la Figura 7.3.

Cuando se compara los valores de entrada de L-leucina, en células crecidas en medios ricos, a baja y alta concentración externa del aminoácido, los mayores valores de entrada se obtuvieron en células provenientes del medio YPD 0,3%.

En células crecidas en medio mínimo VJNH_4^+ , el valor del cociente c_i/c_e es 4 para la cepa MMY2/H3 YCp50 y 7 para la MMY2/H3 YCp50*RAS2val19* a baja concentración; a alta concentración externa el transporte en ambas cepas no es concentrativo. En la Figura 7.4 se observan los gráficos de entrada para ambas cepas transformadas.

En la Figura 7.5 se presentan los gráficos de entrada de L-leucina en medio VJPro, el valor de c_i/c_e es de 15 para la cepa control y de 18 para la cepas MMY2/H3 YCp50*RAS2val19* a baja concentración externa; a alta concentración la relación c_i/c_e es de 4 y 5, respectivamente.

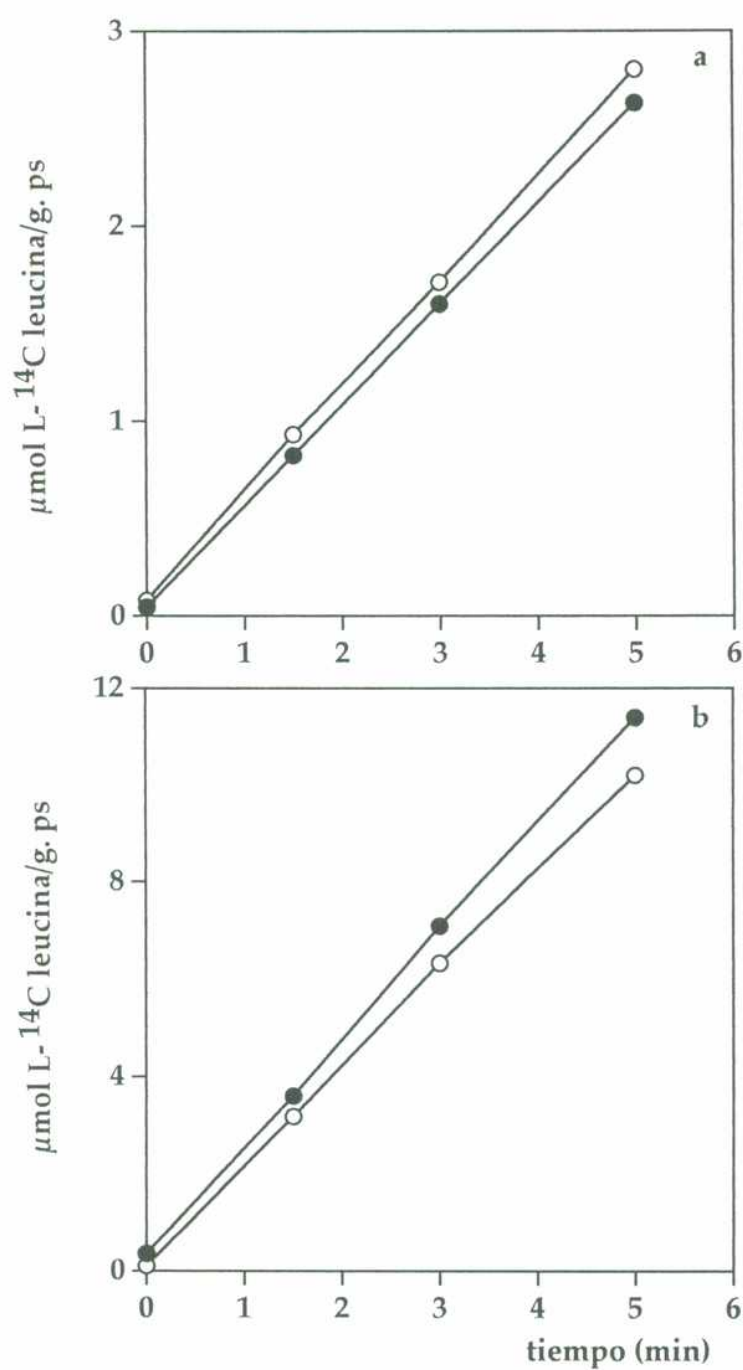


Figura 7.2. Incorporación de L- ^{14}C leucina en las cepas MMY2/H3 YCp50 y MMY2/H3 YCp50RAS2val19 crecidas en medio YPD. La incorporación de L-leucina se midió en células de las cepas MMY2 YCp50 (●) y MMY2 YCp50RAS2val19 (○). Las concentraciones de L-leucina externa fueron 0,05mM (a) y 1,0mM (b).

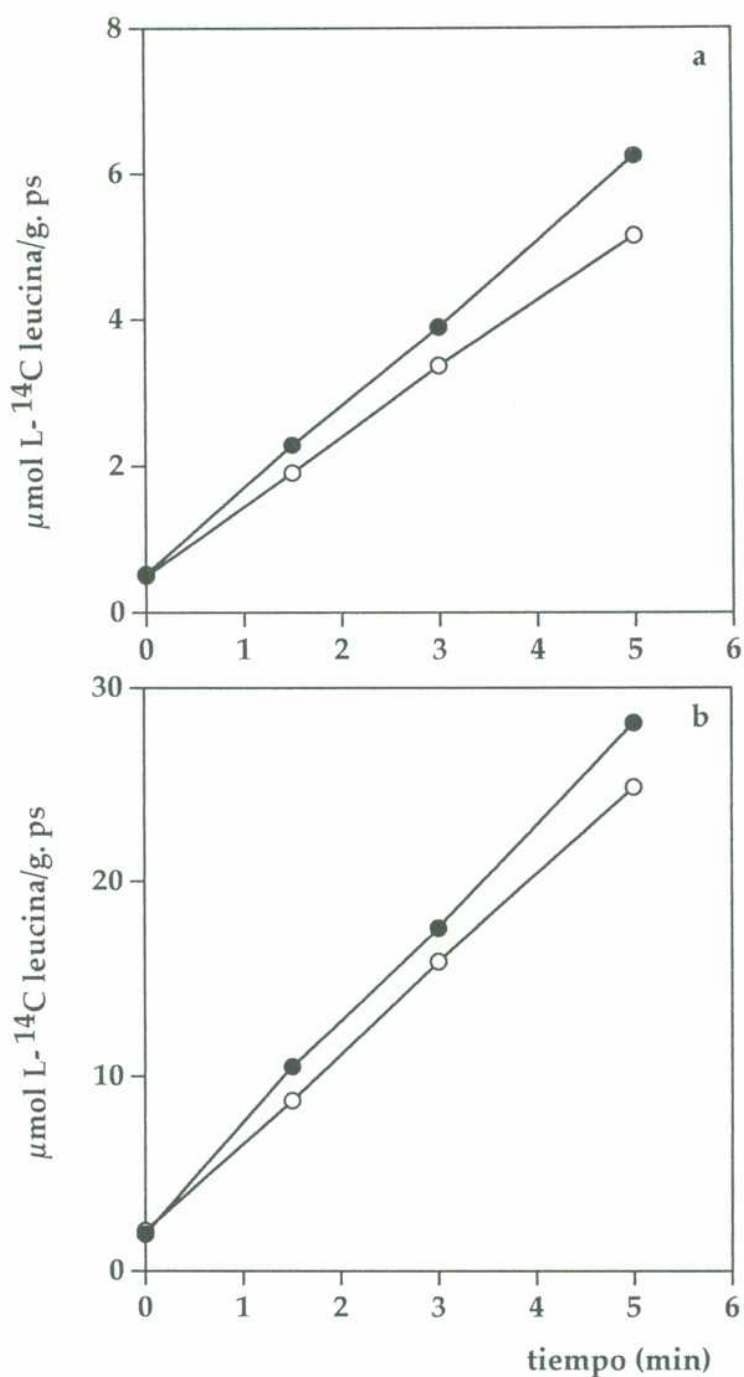


Figura 7.3. Incorporación de L-¹⁴C leucina en las cepas MMY2/H3 YCp50 y MMY2/H3 YCp50RAS2val19 crecidas en medio YPD 0,3%. La incorporación de L-leucina se midió en células de las cepas MMY2 YCp50 (●) y MMY2 YCp50RAS2val19 (○). Las concentraciones de L-leucina externa fueron 0,05mM (a) y 1,0mM (b).

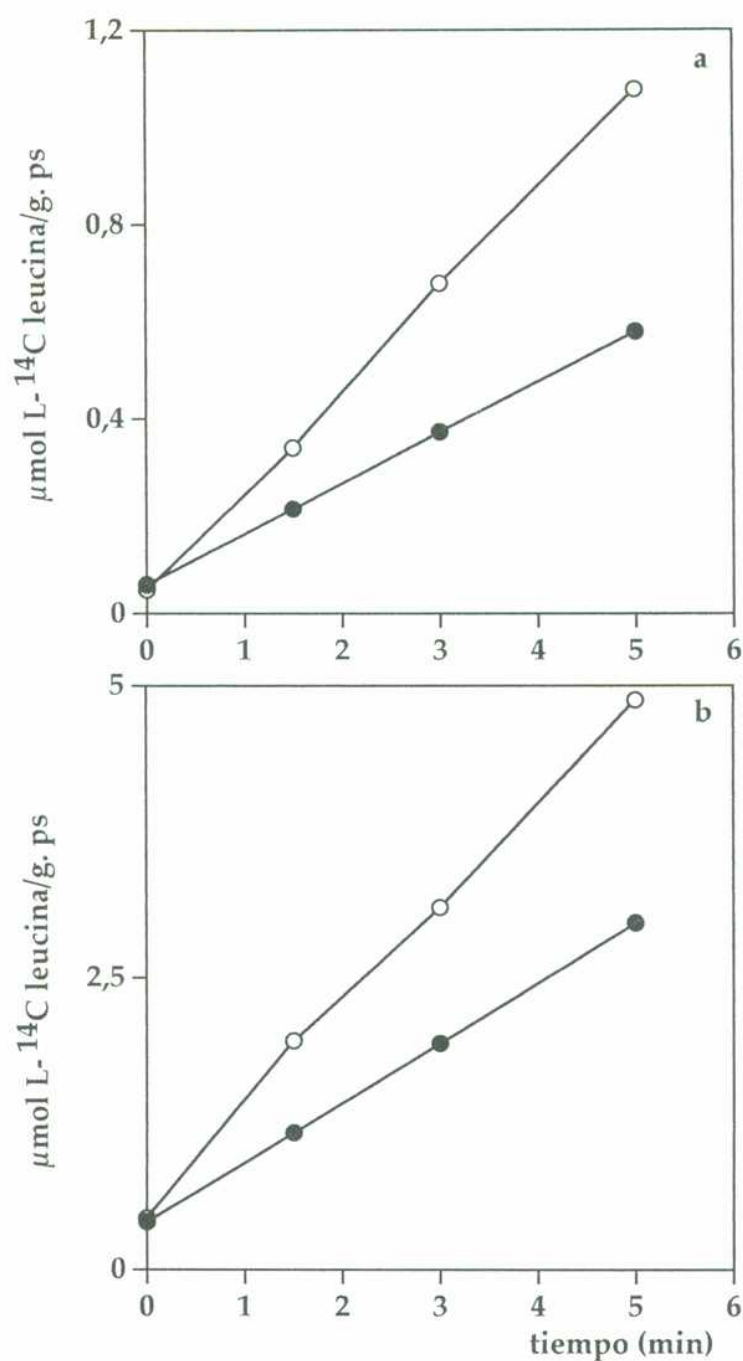


Figura 7.4. Incorporación de L- ^{14}C leucina en las cepas MMY2/H3 YCp50 y MMY2/H3 YCp50RAS2val19 crecidas en medio VJNH $_4^+$.

La incorporación de L-leucina se midió en células de las cepas MMY2 YCp50 (●) y MMY2 YCp50RAS2val19 (○). Las concentraciones de L-leucina externa fueron 0,05mM (a) y 1,0mM (b).

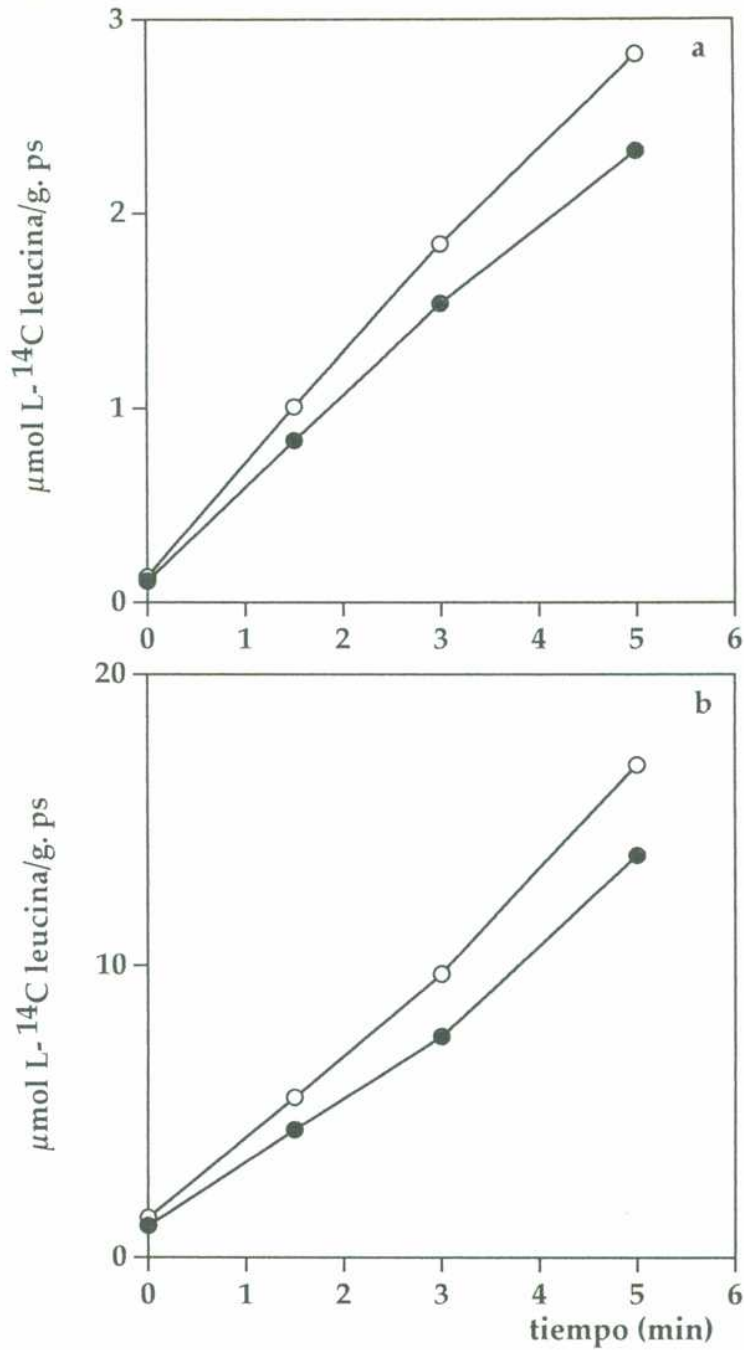


Figura 7.5. Incorporación de L-¹⁴C leucina en las cepas MMY2/H3 YCp50 y MMY2/H3 YCp50RAS2val19 crecidas en medio VJPro. La incorporación de L-leucina se midió en células de las cepas MMY2 YCp50 (●) y MMY2 YCp50RAS2val19 (○). Las concentraciones de L-leucina externa fueron 0,05mM (a) y 1,0mM (b).

7.5. Determinación de la concentración intracelular de protones.

Los valores obtenidos, en el cálculo de pH interno (pHi), se mantienen constantes entre los 3 y 10 minutos de incubación. En la Tabla 7.3 se muestran los promedios de los valores obtenidos en las cepas transformadas crecidas en los diferentes medio de cultivos. No se ha podido encontrar una relación entre el pHi y la la actividad de transporte de L-¹⁴C leucina.

Tabla 7.3. Concentración intracelular de protones.

Cepas	medios de cultivo	pHi
	YPD	
MMY2 YCp50		6,15
MMY2 YCp50RAS2 <i>val19</i>		6,16
	VJNH ₄ ⁺	
MMY2 YCp50		6,17
MMY2 YCp50RAS2 <i>val19</i>		6,13
	VJPro	
MMY2 YCp50		6,41
MMY2 YCp50RAS2 <i>val19</i>		6,50

7.6. Parámetros cinéticos de los sistemas transportadores.

Se caracterizaron cinéticamente los sistemas de transporte de L-leucina presentes en las cepas MMY2/H3 YCp50 y MMY2/H3 YCp50RAS2*val19* crecidas en medios mínimos, como se presenta en la Tabla 7.4. Para ambas cepas crecidas en medios VJNH₄⁺ y VJPro se caracterizaron cinéticamente dos sistemas, obtenidos de acuerdo al método análisis de Eadie-Hofstee, como se observa en la Figura 7.6 y 7.7 respectivamente.

En ambas cepas transformadas crecidas en medios mínimos no se observan diferencias significativas en las afinidades de ambos sistemas. Por el contrario, se detecta un aumento en las capacidades de ambos sistemas en la cepa MMY2/H3 YCp50RAS2*val19*, con respecto a la cepa control.

Tabla 7.4. Parámetros de cinéticos para L-leucina.

Cepas	medios de cultivo	K _{T1}	J _{máx1}	K _{T2}	J _{máx2}
VJNH ₄ ⁺					
MMY2/H3 YCp50		0,07	0,25	0,48	0,76
MMY2/H3 YCp50RAS2 <i>val19</i>		0,06	0,38	0,44	1,18
VJPro					
MMY2/H3 YCp50		0,08	0,59	0,46	1,60
MMY2/H3 YCp50RAS2 <i>val19</i>		0,09	0,94	0,45	2,05

Los valores se calcularon por el método de análisis de Eadie-Hofstee según las representaciones de las Figuras 7.6 y 7.7. K_T en mM y J_{máx} en μmol/g. min.

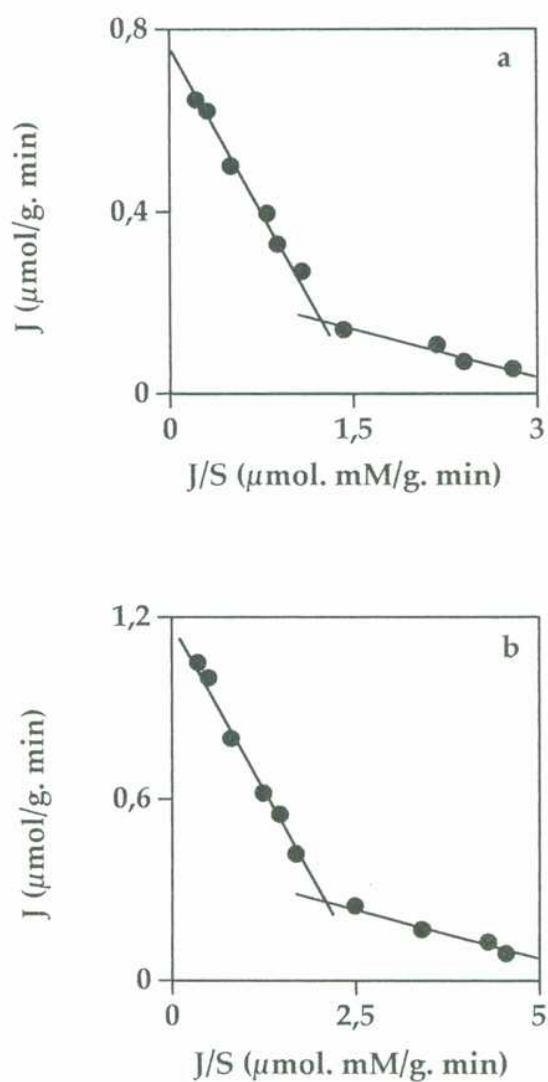


Figura 7.6. Cinética de entrada de L-leucina en las cepas MMY2/H3 YCp50 (a) y MMY2/H3 YCp50RAS2val19 (b) crecidas en medio VJNH₄⁺. Representaciones de Eadie-Hofstee.

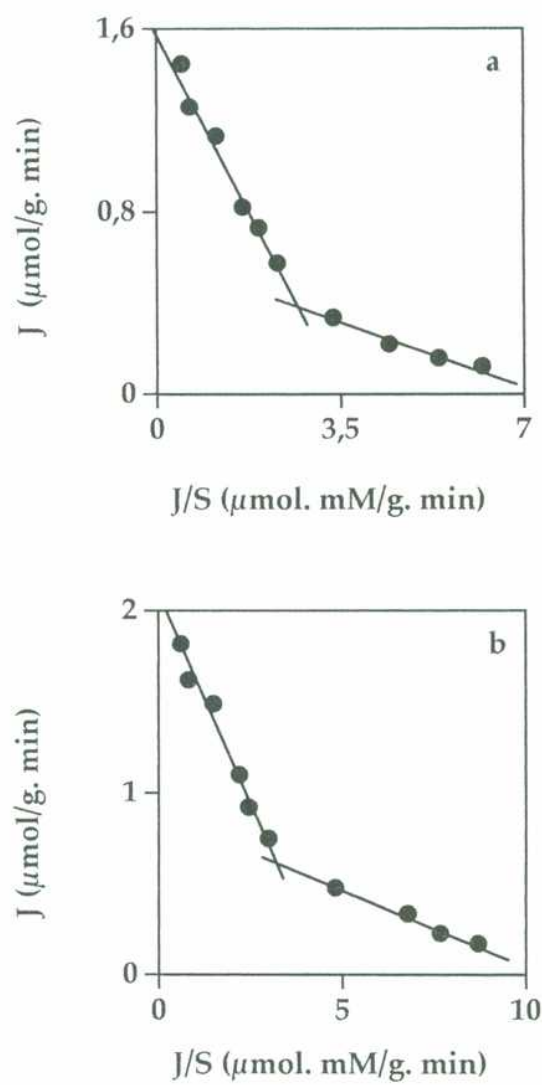


Figura 7.7. Cinética de entrada de L-leucina en las cepas MMY2/H3 YCp50 (a) y MMY2/H3 YCp50RAS2val19 (b) crecidas en medio VJPro. Representaciones de Eadie-Hofstee.

7.7. Efecto de L-aminoácidos sobre la entrada de L-¹⁴C leucina.

En la Tabla 7.5 se observan los resultados obtenidos de la entrada de L-leucina en presencia de diferentes L-aminoácidos, en las cepas MMY2/H3 YCp50 y MMY2/H3 YCp50*RAS2val19*. L-leucina presenta los mayores porcentajes de inhibición, 55-66% a la menor concentración y 66-81% a 1,0 mM de L-leucina externa, mientras que L-citrulina y L-prolina no inhiben significativamente, a las dos concentraciones externas de L-leucina empleadas.

7.8. Incorporación de L-¹⁴C citrulina.

Se investigó la actividad de la GAP1 utilizando L-¹⁴C citrulina como sustrato. Los valores de velocidades iniciales de entrada de L-citrulina en ambas cepas transformadas, crecidas en medios mínimos VJNH₄⁺ y VJPro, son menores a 0,010 μmol/g. min para ambas cepas, como se muestra en la Tabla 7.6. Estos valores son similares a los ya obtenidos en la cepa MMY2/H3, así como para las cepas con actividad de GAP1 pero en condiciones de represión.

Tabla 7.5. Ensayos de inhibición.

Inhibidor	medios de cultivo	[L-leucina] _{ext} =0,05mM		[L-leucina] _{ext} =1,0mM	
		MMY2/H3 YCp50	MMY2/H3 YCp50 <i>RAS2^{tr19}</i>	MMY2/H3 YCp50	MMY2/H3 YCp50 <i>RAS2^{tr19}</i>
VJNH ₄ ⁺					
control		1,039	0,678	5,730	2,980
L-leucina		0,469 (55)	0,269 (60)	1,931 (66)	0,986 (67)
L-citrulina		0,944 (9)	0,632 (7)	5,180 (10)	2,825 (5)
L-prolina		0,999 (4)	0,644 (5)	5,226 (9)	2,852 (4)
VJPro					
control		1,535	1,842	7,576	9,709
L-leucina		0,535 (65)	0,704 (62)	1,410 (81)	2,010 (79)
L-citrulina		1,507 (2)	1,781 (3)	7,212 (5)	9,049 (7)
L-prolina		1,434 (7)	1,720 (7)	7,129 (6)	9,427 (3)

Valores controles en μ moles de L-¹⁴C leucina/g. ps cél a t=3min. Entre paréntesis, porciento de inhibición.

Tabla 7.6. Velocidades iniciales de entrada de L-citrulina en medios VJNH₄⁺ y VJPro.

Cepas	[L-citrulina] _{ext} =0,05mM	
	VJNH ₄ ⁺	VJPro
MMY2/H3 YCp50	0,006	0,008
MMY2/H3 YCp50RAS2 <i>val19</i>	0,005	0,009

Velocidades iniciales de entrada en μ moles de L-¹⁴C citrulina/g. min.

DISCUSSION

En células de levadura *Saccharomyces cerevisiae* el transporte de L-leucina es mediado por la operación de tres sistemas S1, S2 y la permeasa general de aminoácidos, GAP1. El sistema S1 es de alta afinidad y baja capacidad, el sistema S2 es de baja afinidad y alta capacidad, operando preferentemente a bajas y altas concentraciones de L-leucina externas respectivamente; por otro lado la GAP1 es de alta afinidad y alta capacidad. La actividad de todos estos sistemas es regulada por la fuente de nitrógeno del medio de cultivo.

La proteína RAS2 en *S. cerevisiae* participa en numerosos procesos fisiológicos y metabólicos, a través de la regulación de la síntesis de AMPc en la vía RAS/PKA. Los fenotipos que presentan las cepas que poseen mutaciones en dicha vía pueden ser divididos en dos categorías dependiendo si la mutación resulta en una activación (*bcy1*, *ira* o *RAS2val19*) o inactivación (*cyr1*, *cdc25* o *ras1ras2*) de la proteína quinasa A.

Una alta actividad de proteína quinasa A produce modificaciones covalentes, involucrando fosforilaciones, de las enzimas que intervienen en las diferentes vías metabólicas conduciendo a una pérdida en el almacenamiento de carbohidratos de reserva (glucógeno y trehalosa), activación de la vía glucolítica e inducción de la transcripción de un número de genes específicos del crecimiento, represión de algunas proteínas protectoras de estrés; en células haploides permite un crecimiento mitótico normal, mientras que en células diploides está inhibida la esporulación.

En una situación recíproca, bajos niveles de proteína quinasa A producen acumulación de carbohidratos de reserva, activación de la gluconeogénesis, reducción de la transcripción de un número de genes específicos del crecimiento e inducción de varias proteínas relacionadas con el estrés celular.

A pesar de conocerse algunos de los blancos de la actividad de esta enzima, hasta el presente se desconoce si la misma esta involucrada en el proceso de transporte en células de levadura.

Trabajos previos, observaron en levaduras de *S. cerevisiae* preincubadas con altas concentraciones externas de AMPc, producía un

aumento en las velocidades de transporte de L-leucina (Ramos y col., 1977). Resultados similares sobre el transporte de aminoácidos, fueron presentados en levaduras de la especie *Schizosaccharomyces pombe* (Foury y Goffeau, 1975; Sychrová y col., 1989).

El objetivo de este trabajo fue establecer el efecto del gen *RAS2* sobre la actividad de los sistemas de transporte de L-leucina en diferentes mutantes de *S. cerevisiae*.

En la cepa haploide silvestre 308 y sus mutantes nucleares 301 (*RAS2val19*) y 131 (*ras2::LEU2*) de *Saccharomyces cerevisiae*, se pueden caracterizar cinéticamente en medio complejo YPD y medios mínimos, con amonio o L-prolina como única fuente de nitrógeno, dos sistemas de transporte para L-leucina con afinidades (K_T) y capacidades ($J_{máx}$) (Tabla 4.3) similares a las obtenidas para los sistemas S1 y S2 (Kotliar y col., 1994). La excepción fue la cepa 301, células crecida en medio $VJNH_4^+$, donde se caracterizó cinéticamente, solo el sistema de alta afinidad para el transporte de L-leucina (Figura 4.6b).

L-citrulina es transportada casi exclusivamente por la permeasa general de aminoácidos, *GAP1*, característica que permite identificar mutantes *gap1* en medios de cultivo con este aminoácido como fuente de nitrógeno (Grenson y col., 1970). Para establecer el grado de participación de la *GAP1* en las cepas 308, 301 y 131 en las condiciones de trabajo y medios empleados se determinó: 1- el efecto de L-citrulina sobre la entrada de L- ^{14}C leucina y 2- la entrada de L- ^{14}C citrulina.

No se observa un efecto de inhibición de L-citrulina sobre la entrada de L- ^{14}C leucina (Tabla 4.4). Datos concordantes se obtuvieron comparando las velocidades iniciales de transporte (v_i) de L- ^{14}C citrulina en células crecidas en medio $VJNH_4^+$ y *VJPro* (Tabla 4.5). Los valores de las velocidades iniciales obtenidos son menores a los determinados para dicho aminoácido en otras cepas silvestres y no se encuentran variaciones cuando se comparan las v_i de L-leucina en células crecidas en ambos medios de cultivo (Grenson y col., 1970).

Teniendo en cuenta los resultados expuestos anteriormente, es

posible concluir que en las condiciones experimentales utilizadas y con este transfondo genético, la GAP1 no participa en el transporte de L-leucina aún en condiciones de desrepresión de la misma.

No ha sido descrito la ausencia del sistema general de aminoácidos en las cepas corrientemente utilizadas para ensayos de transporte y considerando además que células crecidas en medios de cultivo complejos, reprimen la actividad de la GAP1, los sistemas S1 y S2 tienen un papel fundamental en el transporte de L-leucina (Kotliar y col., 1990 y 1994).

Esto permite estudiar la actividad de los sistemas de transporte de L-leucina, S1 y S2, en una cepa silvestre y sus mutantes *RAS2*, sin interferencia de la GAP1 en diferentes condiciones metabólicas.

A este respecto, es importante destacar que en la cepa 301, cuando se compara las velocidades iniciales de entrada de L-leucina (Tabla 4.6) en células crecidas en medios VJPro/VJNH₄⁺, no hay un aumento en la actividad de los sistemas de transporte S1 y S2; mientras que para la cepa 131 esta relación es máxima.

Considerando estos resultados y que tanto en cepas haploides como diploides los sistemas S1 y S2 son permeasas amonio-sensibles (Kotliar y col., 1990), es posible afirmar que el producto del gen *RAS2* participa en el mecanismo de regulación por la fuente de nitrógeno del medio de cultivo sobre ambos sistemas transportadores.

En el estudio sobre la actividad de la permeasa general de aminoácidos, el grupo de Grenson M. determinó que por lo menos cinco genes están involucrados en la síntesis y activación de este sistema. El clonado y secuenciación de uno de estos genes, el denominado *NPR1* permitió establecer la secuencia aminoacídica de la proteína codificada por el mismo; la secuencia hallada muestra homología con proteína quinasa (Vandenbol y col., 1990). En base a esta homología presumen que el producto del gen *NPR1*, involucrado en el proceso de reactivación de la GAP1, fosforilaría a dicha permeasa. La forma fosforilada de la GAP1 sería activa mientras que la desfosforilada pasa a una forma inactiva. Otro mecanismo propuesto por la acción de la *NPR1* quinasa sería la supresión, por fosforilación,

de las propiedades inactivantes de uno o de ambos productos de los genes *MUT2* y *MUT4* (Grenson, 1992).

La regulación de la actividad de los sistemas de transporte S1 y S2, por la fuente de nitrógeno del medio de cultivo, en las cepas 308, 301 y 131, podría tener un mecanismo de activación/inactivación mediado por fosforilación dependiente de la actividad de la proteína quinasa A.

Es interesante señalar que la cepa silvestre haploide MMY2 ha sido utilizada para estudiar el efecto de la fuente de nitrógeno del medio de cultivo sobre la actividad de los sistemas transportadores de L-leucina. A partir de esta, en presencia de D-histidina se aisló una mutante *gap1*, MMY2/H3. La actividad de transporte de L-leucina está disminuida por alta concentración de glucosa en el medio de cultivo rico YPD (Figura 5. 1).

Se puede observar que el proceso de entrada de L-leucina y L-citrulina, a la menor concentración externa del aminoácido, es rápidamente saturable para la cepa MMY2 pero es lineal para la cepa MMY2/H3, en células provenientes del medio de cultivo VJPro (Figura 5.3 y 5.7). Cuando se determinan los parámetros cinéticos de transporte de L-leucina en estas condiciones es posible caracterizar cinéticamente un sistema de alta capacidad para la cepa silvestre mientras que para la mutante *gap1*, se caracterizan dos sistemas (Tablas 5.2 y 5.3), uno de alta afinidad y baja capacidad y otro de baja afinidad y alta capacidad, concordantes a resultados previos para los sistemas S1 y S2 (Ramos y col., 1980; Kotliar y col., 1994).

Al caracterizar cinéticamente los sistemas presentes en células de las cepas MMY2 y MMY2/H3 crecidas en medios ricos o $VJNH_4^+$, se obtuvieron valores de afinidad similares a los publicados previamente (Kotliar y col., 1994) mientras que se encontraron algunas diferencias en los valores de las capacidades. En todas estas condiciones experimentales los sistemas de transporte de L-leucina caracterizados fueron los S1 y S2.

El estudio de la cinética de inhibición de entrada de L- ^{14}C leucina por L-citrulina en la cepa MMY2 en condiciones de

desrepresión de la GAP1, se observan dos componentes (Figura 5.6), uno de los cuales es la GAP1 ya que L-citrulina inhibe competitivamente el transporte de L-leucina con un $K_i = 0,08$ mM, un valor similar se obtiene cuando L- ^{14}C citrulina se utiliza como sustrato, $K_t \text{ cit} = 0,07$ mM (Tabla 5.5).

Por lo expuesto anteriormente, es decir que en la cepa MMY2 crecida en condiciones de desrepresión de la GAP1, operan al menos dos sistemas de transporte de L-leucina con superposición en sus actividades, su participación es dependiente de la concentración externa del aminoácido.

Por lo tanto, para eliminar la superposición de las actividades de los diferentes sistemas de transporte de L-leucina presente en la cepa MMY2, se decidió estudiar la actividad de la GAP1, en esta cepa, a través de la entrada e incorporación de L- ^{14}C citrulina.

A pesar de encontrarse inhibición de la entrada de L- ^{14}C leucina por L-citrulina en células de la cepa silvestre MMY2 crecidas en medio VJNH_4^+ (Tabla 5.4), que haría suponer una baja actividad de la GAP1 (Kotliar y col., 1994), no se observan diferencias entre las velocidades iniciales de transporte de L-citrulina en las células MMY2 crecidas en medio VJNH_4^+ y en su mutante *gap1*. Los resultados indican que no hay actividad de GAP1 en la cepa MMY2 crecida en medio VJNH_4^+ y está de acuerdo con el mecanismo de inhibición/represión por iones amonio propuesto para dicha permeasa (Wiame y col., 1985).

Cuando se expresa el genotipo dominante *RAS2val19* en un plásmido centromérico, en células MMY2, se pueden caracterizar dos sistemas de transporte de L-leucina en células crecidas en medios ricos YPD, YPD 0,3% y en medio mínimo VJNH_4^+ (Figuras 6.6, 6.7 y 6.8). En células crecidas en medio VJPro se caracteriza cinéticamente un único sistema de alta capacidad (Figura 6.9); es decir que se encontrarían operando varios sistemas de transporte simultáneamente para L-leucina como se demostró para la cepa MMY2.

Los parámetros cinéticos de L-leucina en las cepas MMY2 YCp50 y MMY2 YCp50RAS2*val19* no muestran diferencias, salvo en células MMY2 YCp50RAS2*val19* crecidas en medio VJNH₄⁺, donde la capacidad del sistema S1 es mayor (Tabla 6. 3).

Utilizando L-¹⁴C citrulina para el estudio cinético de la GAP1, en las cepas MMY2 YCp50 y MMY2 YCp50RAS2*val19*, se observa que la velocidad inicial de transporte de L-citrulina se incrementa un 40% en la cepa MMY2 YCp50RAS2*val19* con respecto a la cepa control. No se han hallado diferencias significativas, entre ambas cepas, en las constantes cinéticas de transporte para L-citrulina (Tabla 6.6).

En las cepas MMY2/H3 YCp50 y MMY2/H3 YCp50RAS2*val19* se caracterizan cinéticamente dos sistemas para L-leucina con constantes del orden a los ya descritos para S1 y S2 (Figura 7.6 y 7.7).

Como en el caso de las cepas MMY2 y MMY2/H3 transformadas, sólo aumenta la actividad de los sistemas transportadores de L-leucina, S1 y S2, en células en las que se expresa el gen RAS2*val19*, crecidas en medio mínimo con iones amonio como única fuente de nitrógeno (Tabla 7.4).

Tanto en las cepas 308, 301 y 131 como en las cepas MMY2 y sus derivadas no se observan diferencias en los tiempos de generación ni en la relación del transporte de L-leucina y la concentración intracelular de protones.

No puede descartarse que en *S. cerevisiae* los procesos de fosforilación/desfosforilación, además de regular la actividad de un sin número de procesos metabólicos, afecten la actividad de los sistemas de transporte de aminoácidos.

CONCLUSIONES

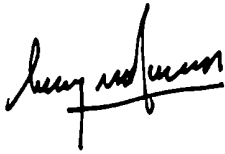
Hasta el presente no se han informado resultados concernientes en investigaciones sobre la participación del gen *RAS2* en los procesos de transporte de aminoácidos en levaduras. Los resultados presentados en este trabajo de tesis demuestran la existencia de una relación entre las actividades de transporte de L-leucina y el gen *RAS2* en *Saccharomyces cerevisiae*.

- 1- El tiempo de generación y el tiempo en alcanzar la fase logarítmica tardía de cada cepa no varía respecto a los valores de su correspondiente cepa control en cada condición de crecimiento ensayada.
- 2- Las cepas 308 (*RAS2*), 301 (*RAS2val19*) y 131 (*ras2::LEU2*) de *S. cerevisiae* crecidas en diferentes medios de cultivo no exhiben actividad de GAP1, aun en condiciones de desrepresión de la permeasa general de aminoácidos.
- 3- Las cepas 308, 301 y 131 poseen distinta actividad de *RAS2*, dicha proteína afecta la regulación por la fuente de nitrógeno del medio de cultivo de los sistemas de transporte de L-leucina S1 y S2.
- 4- En células de la cepa silvestre MMY2 y su mutante *gap1* crecidas en medio rico YPD 0,3%, el transporte de L-leucina es mayor que en estas células crecidas en medio YPD.
- 5- En la cepa MMY2 crecida tanto en los medios complejos como en medio mínimo VJNH₄⁺ no se detecta actividad de GAP1, operando solamente los sistemas S1 y S2.

- 6- En cepas MMY2 y MMY2/H3 crecidas en los diferentes medios de cultivo no se observan diferencias en las afinidades de sus sistemas de transporte de L-leucina, pero sí en las capacidades.
- 7- En las cepas MMY2 YCp50 y MMY2 YCp50*RAS2val19* la actividad de transporte de L-leucina es mayor en células crecidas en medio YPD 0,3% que en células crecidas en medio YPD.
- 8- No se detectan diferencias en la actividad de transporte de L-leucina en las cepas MMY2 YCp50 y MMY2 YCp50*RAS2val19* crecidas en medios complejos y en medio mínimo VJPro.
- 9- La actividad de transporte aumenta en la cepa transformada MMY2 YCp50*RAS2val19* respecto a la cepa control, en medio VJNH₄⁺.
- 10-Sólo se detecta un leve incremento en la capacidad del sistema S1 en la cepa MMY2 YCp50*RAS2val19* respecto a la cepa MMY2 YCp50. Todos los sistemas, caracterizados cinéticamente en ambas cepas crecidas en los diferentes medios de cultivo, presentan valores de K_T similares.
- 11-En las cepas MMY2 YCp50 y MMY2 YCp50*RAS2val19* no se detecta actividad de GAP1 cuando crecen en medio VJNH₄⁺.
- 12-La afinidad y la capacidad de la permeasa general de aminoácidos no difieren entre la cepa MMY2 YCp50*RAS2val19* y su control MMY2 YCp50 crecida en medio VJPro.
- 13-En las cepas MMY2/H3 YCp50 y MMY2/H3 YCp50*RAS2val19* la actividad de los sistemas S1 y S2 es máxima cuando las células crecen en medio YPD 0,3%.

14-En la cepa MMY2/H3 YCp50*RAS2val19* y su control MMY2/H3 YCp50, no se observan diferencias en las afinidades de los sistemas S1 y S2, pero sí en sus capacidades.

15-No se establece una relación estricta entre la actividad de transporte de L-leucina y la concentración intracelular de protones, tanto en las cepas controles como en sus mutantes *RAS2*.

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Luis Rodriguez'.A stylized handwritten signature in black ink, possibly reading 'J. Rodriguez'.

REFERENCIAS

- Argüelles, J. C., Mbonyi, K., Van Aelst, L., Vanhalewyn, M., Jans, A. W. H. and Thevelein, J. M. (1990) *Arch. Microbiol.* **154**, 199-205.
- Barbacid, M. (1987) *Annu. Rev. Biochem.* **56**, 779-827.
- Becker, D. M. and Guarante, L. (1991) en *Methods in Enzymology. Guide to Yeast Genetics and Molecular Biology.* vol 194 pág. 182-186. (Guthrie, C. and Fink, G.R. editores). Academic Press. San Diego. CA.
- Bell, G. I., Valenzuela, P. and Rutter, W. J. (1977) *J. biol Chem.* **252**, 3082-3089.
- Beullens, M., Mbonyi, K., Geerts, L., Gladines, D., Detremerie, K., Jans, A. W. H. and Thevelein, J. M. (1988) *Eur. J. Biochem.* **172**, 227-231.
- Boguski, M. S. and Mc Cormick, F. (1993) *Nature.* **366**, 643-654.
- Bollag, G. and Mc Cormick, F. (1991) *Annu. Rev. Cell. Biol.* **7**, 601-632.
- Brevario, D., Hinnebusch, A., Cannon, J., Tatchell, K. and Dhar, R. (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **83**, 4152-4156.
- Brevario, D., Hinnebusch, A. and Dhar, R. (1988) *EMBO J.* **7**, 1805-1813.
- Broach, J. R. (1991) *Trends Genet.* **7**, 28-32.
- Broek, D., Samily, N., Fasano, O., Fujiyama, A., Tamanoi, F., Northup, J. and Wigler, M. (1985) *Cell.* **41**, 763-769.
- Bussereau, F., Dupont, C. H., Boy-Marcote, E., Mallet, L. and Jacquet, M. (1992) *Curr. Genet.* **21**, 325-329.

- Cameron, S., Levin, L., Zoller, M. and Wigler, M. (1988) *Cell*. **53**, 555-566.
- Cannon, J. F. and Tatchell, K. (1987) *Mol. Cell. Biol.* **7**, 2653-2663.
- Cannon, J. F., Gitan, R. and Tatchell, K. (1990) *J. Biol. Chem.* **265**, 11897-11904.
- Cartwright, C. P., Rose, A. H., Cardelbanc, J and Keenan, M. H. J. (1989) *The Yeast*, vol. 3. capitulo 2, pág. 5-56. (Rose A. H. y Harrison J. R. editores). Academic Press, Londres y NY.
- Caspersen, G. F., Walker, N. and Bourne, H. R. (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **82**, 5060-5063.
- Clarke, S. (1992) *Annu. Rev. Biochem.* **61**, 355-386.
- Cobitz, A. R., Yim, E. H., Brown, W. R., Perou, C. M. and Tamanoi, F. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **86**, 858-862.
- Cooper, T. G. (1982) en *The Molecular Biology of the Yeast Saccharomyces. Metabolism and Gene Expression*. pág 399-461. (Strathern, J. N., Jones. E. W. and Broach, J. R. editores) Cold Spring Harbor Laboratory. NY.
- Crabell, M. and Grenson, M. (1970) *Eur. J. Biochem.* **14**, 197-204.
- Créchet, J. B., Pouillet, P., Mistou, M. Y., Parmeggiani, A., Camonis, J., Boy-Marcotte, E., Damark, F. and Jacquet, M. (1990) *Science* **248**, 866-868.
- Darte, C and Grenson, M. (1975) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **67**, 1028-1033.

- Dhar, R., Nieto, A., DeFeo-Jones, D. and Scolnick, E. M. (1984) *Nucleic Acids Res.* **12**, 3611-3318.
- De Bongioanni, L. C. and Ramos, E. H. (1988) *Rev. Arg. Microbiol.* **20**, 1-15.
- DeFeo-Jones, D., Scolnick, E. M., Koller, R. and Dhar, R. (1983) *Nature* **306**, 707-709.
- DeFeo-Jones, D., Tatchell, K., Robinson, L.C., Sigal, I. S., Vass, W. C., Lowy, D. R. and Scolnick, E. M. (1985) *Nature* **228**, 179-184.
- Durnez, P., Pernambuco, M. B., Oris, E., Argüelles, J. C., Mergelsberg, H. and Thevelein, J. M. (1994) *Yeast* **10**, 1049-1064.
- Eleutherio, E. C. A., Araujo, P. S and Panek, A. D. (1993) *Biochim. Biophys. Acta* **1156**, 263-266.
- Fasano, O., Aldreich, T., Tamanoi, F., Taparowsky, E., Furth, M. and Wigler, M. (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **81**, 4008-4012.
- Fedor-Chaiken, M., Deschenes, R. J. and Broach, J. R. (1990) *Cell.* **61**, 329-340.
- Fernández-Bañares, I., Clotet, J., Ariño, J. and Guinovart, J. J. (1991) *FEBS Lett.* **290**, 38-42.
- Field, F., Vojtek, A., Ballester, R., Bolger, G., Colicelli, J., Ferguson, K., Gerst, J., Kataoka, T., Michaeli, T., Powers, S., Riggs, M., Rodgers, L., Wieland, I., Wheland, B. and Wigler, M. (1990) *Cell.* **61**, 319-327.
- Field, F., Xu, H., Michaeli, T., Ballester, R., Sass, P., Wigler, M. and Colicelli, J. (1990) *Nature* **247**, 464-467.

- Foury, F. and Goffeau, A. (1975) *J. biol Chem.* **250**, 2354-2362.
- François, J., Van Schaftingen, E. and Hers, H. G. (1984) *J. biol Chem.* **147**, 187-193.
- François, J., Villanueva, M. E. and Hers, H. G. (1988) *Eur. J. Biochem.* **174**, 551-559.
- François, J., Neves, M. J. and Hers, H. G. (1991) *Yeast* **7**, 575-587.
- Fujiyama, A. and Tamanoi, F. (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **83**, 1266-1270.
- Fujiyama, A., Matsumoto, K. and Tamanoi, F. (1987) *EMBO J.* **6**, 223-228.
- Gancedo, J. M., Mazon, M. J. and Gancedo, C. (1983) *J. biol Chem.* **258**, 5998-5604.
- Gibbs, J. and Marshall, M. S. (1989) *Microbiol. Rev.* **53**, 171-185.
- Gits, J. J. and Grenson, M. (1967) *Biochim. Biophys. Acta.* **135**, 507-516.
- Grenson, M., Mousset, M., Wiame, J. M. and Béchet, J. (1966) *Biochim. Biophys. Acta.* **127**, 325-338.
- Grenson, M. (1966) *Biochim. Biophys. Acta.* **127**, 339-346.
- Grenson, M., Crabeel, M., Wiame, J. M. and Béchet, J. (1968) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **30**, 414-419.
- Grenson, M. (1969) *Eur. J. Biochem.* **11**, 249-261.
- Grenson, M., Hou, C. and Crabeel, M. (1970) *J. Bacteriol.* **103**, 770-777.

- Grenson, M. and Dubois, E. (1982) *Eur. J. Biochem.* **121**, 643-647.
- Grenson, M. (1983a) *Eur. J. Biochem.* **133**, 135-139.
- Grenson, M. (1983b) *Eur. J. Biochem.* **133**, 141-144.
- Grenson, M., Muyldermans, F., Broman, K. and Vissers, S. (1987) *Life Sci. Adv.* **6**, 35-39
- Grenson, M. (1992) en *Molecular Aspects of Transport Proteins*, pág, 219-245. (Elsevier Sciences Publishers B.V.).
- Gretchen, L. T., Jackson, B.G., D'Alonso, J. S., Sigal, I. S. and Scolnick, E. M. (1985) *Nature* **313**, 700-703.
- Gross, E., Goldberg, D. and Levitzki, A. (1992) *Nature* **360**, 762-765.
- Han, K., Hong, J. and Lim, H. (1994) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **203**, 640-645.
- Hartwell, L. H. (1974) *Bacteriol. Rev.* **38**, 164-198.
- Haubruck, H. and Mc Cormick, F. (1991) *Biochim. Biophys. Acta* **1072**, 215-229.
- Horak, J. (1986) *Biochim. Biophys. Acta.* **864**, 223-256.
- Hottiger, T., Schmutz, P. and Wiemken, A. (1987) *J. Bacteriol.* **169**, 5518-5522.
- Hottiger, T., Boller, T. and Wiemken, A. (1989) *FEBS Lett.* **255**, 431-434.

- Jacquet, E., Parrini, M.C., Bernardi, A., Martegani, E. and Parmeggiani, A. (1994) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **199**, 497-503.

- Johnston, M. and Carlson, M. (1992) en *The Molecular and Cellular Biology of de Yeast. Saccharomyces cerevisiae. Gene Expression. Vol 2* pág 193-281 (Jones, E. W., Pringle, J. R. and Broach, J. R. editores). Cold Spring Harvor Laboratory Press. NY.

- Kataoka, T., Broek, D. and Wigler, M. (1985) *Cell.* **73**, 493-505.

- Kinney, A. J., Bae-Lec, M., Panghaal, S. S., Kelley, M. J., Gaynor, P. M. and Carman, G. M. (1990) *J. Bacteriol.* **172**, 1133-1136.

- Kotliar, N. and Ramos, E. H. (1983) *Biochim. Biophys. Acta.* **734**, 378-380.

- Kotliar, N., Stella, C. A. and Ramos, E. H. (1990) *Rev. Arg. Microbiol.* **22**, 7-16.

- Kotliar, N., Stella, C. A., Ramos, E. H. and Mattoon, J. R. (1994) *Cell. mol. Biol.* **40**, 833-842.

- Kreutzfeldt, C. and Witt, W. (1991) en: *Biotechnology Handbooks. 4. Saccharomyces. capítulo 2*, pág. 32-39, (Tuite, M. F. and Oliver, S. G. editores). Plenum Press.

- Lasko, P. F. and Brandriss, M. C. (1981) *J. Bacteriol.* **148**, 241-247.

- Lowy, D. R., Zhang, K., Decluc, J. E. and Willumsen B. M. (1991) *Trends Genet.* **7**, 346-351.

- Lowy, D. R. (1993) *Annu. Rev. Biochem.* **62**, 851-891.

- Malone, R. E. (1990) *Cell* **61**, 375-378.
- Marchler, G., Schüller, C., Adam, G. and Ruis, H. (1993) *EMBO J.* **12**, 1997-2003.
- Matsumoto, K., Uno, I., Ishikawa, T. and Oshima, Y. (1982a) *J. Bacteriol.* **150**, 277-285.
- Matsumoto, K., Uno, I., Oshima, Y. and Ishikawa, T. (1982b) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **79**, 2355-2359.
- Matsumoto, K., Uno, I., Ishikawa, T. and Oshima, Y. (1983) *J. Bacteriol.* **156**, 898-900.
- Matsumoto, K., Uno, I. and Ishikawa, T. (1984) *J. Bacteriol.* **157**, 277-282.
- Matsuura, A., Treinin, M., Mitsuzawa, H., Kassir, Y., Uno, I. and Simchen, G. (1990) *EMBO J.* **9**, 3225-3232.
- Matsuura, A. and Anraku, Y. (1993) *Mol. Gen. Genet.* **238**, 6-16.
- Matsuura, A. and Anraku, Y. (1994) *Mol. Gen. Genet.* **242**, 257-262.
- Mbonyi, K., Beullens, M., Detremerie, K., Geerts, L. and Thevelein, J. M. (1988) *Mol. Cell. Biol.* **8**, 3051-3057.
- Mbonyi, K., Van Aelst, L., Argüelles, J. C., Jans, A. W. H. and Thevelein, J. M. (1990) *Mol. Cell. Biol.* **10**, 4518-4523.
- Mitsuzawa, H., Uno, I., Oshima, Y. and Ishikawa, T. (1989) *Genetics* **123**, 739-748.
- Ortiz, C. H., Maia, J. C. C., Tenan, M. N., Braz-Pradão, G. R., Mattoon, J. R. and Panek, A. D. (1983) *J. Bacteriol.* **153**, 644-651.

- Panek, A.D. (1991) en: *The Yeast*, vol. 4. capítulo 13, pág. 655-678. (Rose A. H. y Harrison J. R. editores). Academic Press, Londres y NY.
- Panek, A.D. (1994) *Genetics* **136**, 485-503.
- Pardo, L. A., Lazo, P. S. and Ramos, S. (1993) *FEBS Lett.* **319**, 237-243.
- Petitjean, A. Hilger, F. and Tatchell, K. (1990) *Genetics.* **124**, 798-806.
- Plummer, A. R. and Matton, J.R. (1992) *An. Asoc. Quim. Argent.* **80**, 127-137.
- Powers, S., Kataoka, T., Fasano, O., Goldfarb, M., Strathern, J., Broach, J. R. and Wigler, M. (1984) *Cell.* **36**, 607-612.
- Powers, S., Gonzales, E., Christensen, T., Cubert, J. and Broek, D. (1991) *Cell.* **65**, 1225-1231.
- Powers, S. (1992) *Sem. Cancer Biol.* **3**, 209-218.
- Ramos, E. H., De Bongioanni, L. C., Claisse, M. L. and Stoppani, A. O. M. (1975) *Biochim. Biophys. Acta.* **397**, 470-481.
- Ramos, E. H., De Bongioanni, L. C., Cuesta Casado, M. C. and Stoppani, A. O. M. (1977) *Biochim. Biophys. Acta.* **467**, 220-237.
- Ramos, E. H., De Bongioanni, L. C., Stoppani, A. O. M. and Kurlat, I. (1979) *Rev. Asoc. Arg. Microbiol.* **10**, 102-116.
- Ramos, E. H., De Bongioanni, L. C., and Stoppani, A. O. M. (1980) *Biochim. Biophys. Acta.* **559**, 214-231.
- Ramos, E. H., De Bongioanni, L. C., Wainer, S. R. and Stoppani, A. O. M. (1983) *Biochim. Biophys. Acta.* **731**, 361-372.

- Resnick, R. J. and Racker, E. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **85**, 2474-2478.
- Rytka, J. (1975) *J. Bacteriol.* **121**, 562-570.
- Schomerus, C., Murder, T. and Küntzel, H. (1990) *Mol. Gen. Genet.* **223**, 426-432.
- Shirayama, M., Matsui, Y., Tanaka, K. and Toh-e, A. (1994) *Yeast* **10**, 451-461.
- Slavik, J. (1982) *FERS Lett.* **140**, 22-26.
- Stella, C. A., Kotliar, N., Sáenz, D.A., De Bongioanni, L. C. and Ramos, E. H. (1992) *An. Asoc. Quím. Argent.* **80**, 261-269.
- Stoppani, A. O. M. and Ramos, E. H. (1978) in *Biochemistry and Genetics of Yeast*. pág. 171-195 (Bacila, M., Horecker, B. and Stoppani, A. O. M. editores) Academy Press, New York.
- Surdin, Y., Sly, W., Sire, J., Bordes, A.M. and De Robichon-Szumajster, H. (1965) *Biochim. Biophys. Acta.* **107**, 546-552.
- Suzuki, N., Choe, H. R., Nishida, Y., Yamawaki-Kataoka, Y., Ohnishi, S., Tamanoki, T. and Kataoka, T. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **87**, 8711-8715.
- Suzuki, N., Tsujino, K., Minato, T., Nishida, Y., Okada, T. and Kataoka, T. (1993) *Mol. Cell. Biol.* **13**, 769-774.
- Sychrová, H., Horak, J. and Kotyk, A. (1989) *Yeast* **5**, 199-207.
- Tamanoi, F., Wash, M., Kataoka, T. and Wigler, M. (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **81**, 6924-6928.

- Tamanoi, F. (1988) *Biochim. Biophys. Acta* **948**, 1-15.
- Tanaka, K., Matsumoto, K. and Toh-e, A. (1989) *Mol. Cell. Biol.* **9**, 757-768.
- Tanaka, K., Lin, B. K., Wood, D. R. and Tamanoi, F. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **88**, 468-472.
- Tatchell, K., Chaleff, D. T., DeFeo-Jones, D. and Scolnick, E. (1984) *Nature* **309**, 523-527.
- Tatchell, K., Robinson, L. C. and Breitenbach, M. (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **82**, 3785-3789.
- Tatchell, K. (1986) *J. Bacteriol.* **166**, 364-367.
- Thevelein, J. M. (1984) *Arch. Microbiol.* **138**, 64-67.
- Thevelein, J. M. and Beullens, M. (1985) *J. Gen. Microbiol.* **131**, 3199-3209.
- Thevelein, J. M., Beullens, M., Honshoven, F., Hoebeeck, G., Detremere, K., Den Hollander, J. A., Jans, A. W. (1987a) *J. Gen. Microbiol.* **133**, 2191-2196.
- Thevelein, J. M., Beullens, M., Honshoven, F., Hoebeeck, G., Detremere, K., Griewel, B., Den Hollander, J. A., Jans, A. W. (1987b) *J. Gen. Microbiol.* **133**, 2197-2205.
- Thevelein, J. M. (1991) *Mol. Microbiol.* **5**, 1301-1307.
- Toda, T., Cameron, S., Sass, P., Zoller, M. and Wigler, M. (1987a) *Cell.* **50**, 277-287.

- Toda, T., Cameron, S., Sass, P., Zoller, M., Scott, J. D., McMullen, B., Hurwitz, M., Krebs, F. C. and Wigler, M. (1987b) *Mol. Cell. Biol.* **7**, 1371-1377.
- Tullin, S., Gjermansen, C. and Kielland-Brandt, M. C. (1991) *Yeast* **7**, 933-941.
- Uno, I., Matsumoto, K., Adachi, K. and Ishikawa, T. (1984) *J. Biol. Chem.* **259**, 1288-1293.
- Van Aelst, L., Boy-Marcotte, E., Camonis, J.H., Thevelein, J. M. and Jacquet, M. (1990) *Eur. J. Biochem.* **193**, 675-680.
- Van Aelst, L., Jans, A. W. H. and Thevelein, J. M. (1991) *J. Gen. Microbiol.* **137**, 341-349.
- Vandebol, M., Jauniaux, J. C. and Grenson, M. (1990) *Mol. Gen. Genet.* **222**, 393-399.
- Vavra, J. J. and Johnson, M. J. (1956) *J. Biol. Chem.* **220**, 33-43.
- Wainer, S. R., Boveris, A. and Ramos, E. H. (1988) *Arch. Biochem. Biophys.* **262**, 481-490.
- Werner-Washburne, M., Braun, E., Johnston, G. C. and Singer, R. A. (1993) *Microbiol. Rev.* **57**, 383-401.
- Wiame, J. M., Grenson, M. and Arst, H. N., Jr. (1985) *Adv. Microb. Physiol.* **26**, 1-87.
- Wills, C. (1990) *Biochem. Mol. Biol.* **25**, 245-280.

- Wilson, R. B., Renault, G., Jacquet, M. and Tatchell, K. (1993) FEBS Lett. **325**, 191-195.
- Wood, D. R., Pouillet, P., Wilson, B. A., Khalil, M., Tanaka, K., Cannon, J. F. and Tamanoi, F. (1994) J. biol Chem. **269**, 5322-5327.