

Tesis de Posgrado

Sistemas de transporte de aminoácidos neutros en *Saccharomyces cerevisiae*, cepas silvestres y mutantes transporte-defectivas

Chianelli, Mónica Silvia

1998

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:

Chianelli, Mónica Silvia. (1998). Sistemas de transporte de aminoácidos neutros en *Saccharomyces cerevisiae*, cepas silvestres y mutantes transporte-defectivas. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3006_Chianelli.pdf

Cita tipo Chicago:

Chianelli, Mónica Silvia. "Sistemas de transporte de aminoácidos neutros en *Saccharomyces cerevisiae*, cepas silvestres y mutantes transporte-defectivas". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1998.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3006_Chianelli.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

**Sistemas de transporte de aminoácidos neutros en
Saccharomyces cerevisiae, cepas silvestres y
mutantes transporte-defectivas**

por MONICA SILVIA CHIANELLI

Director: Dra Eugenia H. Ramos

Departamento de Bioquímica Humana
Facultad de Medicina
Universidad de Buenos Aires

Tesis presentada para optar al título de:

DOCTOR DE LA UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

1998



Evidencias cinéticas y genéticas muestran que en *Saccharomyces cerevisiae*, la incorporación de los aminoácidos de cadena ramificada L-leucina, L-isoleucina y L-valina es mediada por al menos tres sistemas funcionalmente distintos: la permeasa general de aminoácidos GAP1 (inactiva en presencia de iones amonio) y dos sistemas de transporte más específicos S1 y S2, previamente descritos para el transporte de L-leucina.

En células silvestres cultivadas en medio conteniendo L-prolina, cada uno de los aminoácidos de cadena ramificada exhibe un solo sistema de transporte de alta afinidad y muy alta capacidad. Una mutante *gap1* muestra dos sistemas de transporte para leucina con valores de K_T y $J_{m\acute{a}x}$ similares a aquellos descritos previamente como S1 y S2, y un solo sistema de transporte de baja afinidad- alta capacidad para isoleucina o valina. Una cepa mutante defectiva en los sistemas S1 y S2 que transportan leucina fue aislada a partir de la parental ya deficiente en la permeasa general de aminoácidos, GAP1. La mutante fue seleccionada como una cepa espontánea resistente a trifluorleucina (TFL^r). Esta mutante fue cruzada con una cepa testigo *gap1*, y el análisis de tetradas indicó que la resistencia completa a TFL dependió de la presencia de al menos dos genes mutantes no ligados, denominados *let* (leucine transport). La mutación *let1* inactiva completamente el sistema de transporte de leucina de alta afinidad-baja capacidad definido cinéticamente como S1. Aunque la mutación *let2* causó una marcada disminución en la $J_{m\acute{a}x}$ del sistema S2 de baja afinidad, el transporte residual de leucina en la mutante *gap1let1let2* tuvo el mismo K_T que el de la cepa parental *gap1LET1LET2*. Resultados similares se obtuvieron para los únicos sistemas de transporte de isoleucina o valina. La mutante *gap1let1let2* exhibió una marcada disminución en el crecimiento sobre medio mínimo conteniendo leucina, isoleucina o valina como únicas fuentes de nitrógeno. Además, la asimilación de metionina, fenilalanina, serina, treonina y norleucina estuvo impedida severamente, mientras los aminoácidos básicos y ácidos sostuvieron un crecimiento normal. Esto indica que al menos una de las permeasas de leucina tiene una considerablemente amplia pero aún limitada especificidad. La reversión del gen *gap1* restauró el transporte de los aminoácidos de cadena ramificada. La cepa revertante fue sensible a TFL cuando creció en prolina, pero resistente cuando amonio fue la fuente de nitrógeno.

La segregante (sensible a TFL) *gap1let2* exhibió para cada uno de los aminoácidos de cadena ramificada, solamente un sistema de transporte de alta afinidad-baja capacidad. Esta cepa mostró parámetros cinéticos para el transporte de leucina muy similares a aquellos caracterizados para el sistema S1 en la cepa *gap1*. Cada uno de los sistemas de transporte de alta afinidad de los aminoácidos de cadena ramificada es inhibido competitivamente por los otros dos aminoácidos de cadena ramificada. Además, metionina, norleucina y TFL actúan como inhibidores competitivos del transporte de leucina por el sistema de alta afinidad. En la mutante *gap1let2* la deficiencia en la actividad de S2 resulta en la pérdida de la capacidad de crecer significativamente en medios de cultivo conteniendo treonina, serina y norleucina como únicas fuentes de nitrógeno y un crecimiento reducido sobre los aminoácidos de cadena ramificada individuales, metionina y fenilalanina. Por lo tanto, el gen *LET1* codifica la permeasa de L-aminoácidos de cadena ramificada de alta afinidad-baja capacidad S1, y posiblemente transporte también metionina y -fenilalanina. La permeasa *LET1* (S1) es primariamente responsable de la acumulación intracelular de TFL a niveles tóxicos, porque este sistema no es detectable en la mutante resistente a TFL *gap1let1let2*. En contraste, la segregante *gap1let1* exhibió para cada uno de los aminoácidos de cadena ramificada solamente un sistema de transporte de baja afinidad- alta capacidad. Esta cepa mostró para el transporte de leucina un valor de K_T muy similar a aquel caracterizado para el sistema S2 en la cepa *gap1* aunque con un valor de $J_{m\acute{a}x}$ más alto. Un único sistema de transporte de baja afinidad -alta capacidad para isoleucina o valina mostró similares características. Esta cepa crece normalmente como la cepa *gap1* sobre todas las fuentes de nitrógeno ensayadas. Isoleucina, valina, metionina, alanina y norleucina son inhibidores competitivos del transporte de leucina por el sistema S2. Los valores de K_i están en el orden de los valores de K_T determinados para el transporte de leucina, isoleucina y valina. DL-TFL es un inhibidor competitivo del sistema S2 pero el valor K_i es más grande que el valor de K_T para el transporte de leucina. Por lo tanto, el sistema S2 de baja afinidad- alta capacidad tiene una relativamente amplia especificidad, transportando no sólo los aminoácidos de cadena ramificada sino también metionina, alanina, serina, treonina y norleucina. Estos resultados sugieren que el gen *LET2* codifica un componente asociado a la óptima actividad del sistema S2.

La regulación de la actividad de transporte por la fuente de nitrógeno presente en el medio de cultivo indica que la permeasa *LET1* (S1) no está sujeta a la represión catabólica por nitrógeno ni a la inactivación catabólica por nitrógeno (NCI). En contraste, en la cepa *gap1* la actividad de transporte de L-leucina por S2 es regulada negativamente por los iones amonio. Más aún, en esta condición, el transporte de L-leucina por el sistema S2 en las cepas *gap1* y *gap1let1let2* exhibió parámetros cinéticos similares. En la segregante *gap1let1* el comportamiento regulatorio fue diferente. Las actividades de transporte de los aminoácidos de cadena ramificada por S2 fueron más altas que aquellas obtenidas en las células mutantes *gap1* o *gap1let1let2* crecidas en los medios de cultivo conteniendo L-prolina o iones amonio como únicas fuentes de nitrógeno. Estos resultados sugieren una tercera mutación además de *let1* y *let2* que podría interferir con la incorporación de los aminoácidos de cadena ramificada o de una interacción entre los productos de los genes *LET1* y *LET2*.

Palabras claves: levadura, *Saccharomyces cerevisiae*, permeasa, transporte de aminoácidos, incorporación, L-leucina, L-isoleucina, L-valina, aminoácidos de cadena ramificada, *LET1*, *LET2*, trifluorleucina.

Transport systems of neutral amino acids in *Saccharomyces cerevisiae*, wild type and mutant transport-defective strains

Summary

Kinetic and genetic evidence show that the uptake of L-branched-chain amino acids into *Saccharomyces cerevisiae* is mediated by at least three functionally distinct systems: the general amino acid permease GAP1 (inactive in the presence of ammonium ions), and two transport systems more specific S1 and S2, previously described for L-leucine transport.

Wild type cells grown in medium containing L-proline as nitrogen source, exhibit a single transport system for each of the L-branched-chain amino acids of high-affinity and very high-capacity. A *gap1* mutant shows two transport systems for leucine with K_T and J_{max} values similar to those previously described as S1 and S2, and a single low affinity-high capacity transport system for isoleucine or valine. A strain mutant defective in systems S1 and S2 transporting L-leucine was isolated from the parental strain already deficient in the general amino acid permease, GAP1. The mutant was selected as a spontaneous, trifluoroleucine-resistant (TFL^R) strain. This mutant was crossed with *gap1* tester strain, and tetrad analysis indicated that full resistance to TFL was dependent upon the presence of at least two unlinked mutant genes, denominated *let* (leucine transport). The *let1* mutation completely inactivates the high affinity-low capacity leucine transport system kinetically defined as S1. Although the *let2* mutation caused a marked decrease in the J_{max} of the low affinity system S2, residual transport in the *gap1let1let2* mutant had the same K_T as in the *gap1LET1LET2* parental strain. Similar results were obtained for the single transport system of L-isoleucine or L-valine. The *gap1let1let2* mutant exhibited a marked decrease in growth on minimal medium containing leucine, isoleucine or valine as a sole nitrogen source. Moreover, assimilation of methionine, phenylalanine, serine, threonine and norleucine, was severely impaired, whereas basic and acidic amino acids supported normal growth. This indicates that at least one of leucine permeases has a fairly broad, but yet limited specificity. Reversion of the *gap1* gene restored branched-chain amino acids transport. The revertant strain was sensitive to TFL when grown on proline but resistant to TFL when ammonia was the nitrogen source.

The *gap1let2* (TFL-sensitive) segregant exhibited for each of the L-branched-chain amino acids only one transport system of high affinity-low capacity. This strain showed transport kinetic parameters for L-leucine very similar to those characterized for system S1 in a *gap1* strain. Each of the high-affinity transport systems for the L-branched-chain amino acids is inhibited competitively by the other two branched chain amino acids. In addition, methionine, norleucine and trifluoroleucine act as competitive inhibitors of the high affinity transport system of leucine. In mutant *gap1let2* the deficiency in L-leucine S2 activity results, in the loss of its ability to grow significantly in culture media containing threonine, serine or norleucine as the sole nitrogen source and in a decreased growth on individual branched chain amino acids, methionine and phenylalanine. Therefore, the gene *LET1* encodes for the high affinity-low capacity L-branched-chain amino acids permease S1 and very likely for methionine and phenylalanine as well. The *LET1* permease (S1) is primarily responsible for the intracellular accumulation of TFL up to toxic levels, because this system is not detectable in the TFL-resistant mutant *gap1let1let2*. In contrast, the *gap1let1* segregant exhibited only one system transport of low affinity-high capacity for each of the L-branched-chain amino acids. This strain, showed a transport K_T value for leucine very similar to that characterized for system S2 in a *gap1* strain although with the higher J_{max} value. A single low affinity-high capacity transport system for isoleucine or valine shown similar characteristics. This strain, alike *gap1* strain grows normally on all nitrogen sources assayed. Isoleucine, valine, methionine, alanine and norleucine are competitive inhibitors of the leucine transport system S2. The K_i values are of the same order as the K_T values determined for leucine, isoleucine and valine transport. TFL is a competitive inhibitor of the S2 system but its K_i value is larger than the K_T value for L-leucine transport. Therefore, the low affinity-high capacity system S2 has a relatively broad specificity, transporting not only branched-chain aminoacids but also methionine, alanine, serine, threonine and norleucine. These results suggest that *LET2* encodes for a component which is associated to optimum activity of transport system S2.

Regulation of transport activity by the nitrogen source indicates that S1 permease is not subject to nitrogen catabolite repression (NCR) nor to nitrogen catabolite inactivation (NCI). In *gap1* strain the leucine transport S2 activity is negatively regulated by ammonium ions. Moreover, under this condition leucine transport by S2 system in *gap1* and *gap1let1let2* strains, exhibited similar kinetic parameters. In the segregant *gap1let1* the regulatory behaviour was different. The branched-chain amino acids transport activities by S2 were higher than those obtained in *gap1* or *gap1let1let2* mutant cells grown in culture media containing L-proline or ammonium ions as sole nitrogen source. These results suggest the existence of a third mutation, besides *let1* and *let2* which could interfere with the L-branched chain amino acids uptake or of an interaction between the products of the genes *LET1* and *LET2*.

Key words: yeast, *Saccharomyces cerevisiae*, permease, amino acid transport, uptake, L-leucine, L-isoleucine, L-valine, branched-chain amino acids, *LET1*, *LET2*, trifluoroleucine.

AGRADECIMIENTOS

Muchas personas en distintas formas han colaborado haciendo posible la realización de este trabajo de tesis. A ellas quisiera expresar mi agradecimiento.

A la Dra. Eugenia H. Ramos, por haberme iniciado en la investigación científica, por su estímulo, su constante apoyo y confianza que me brindó durante el desarrollo de la presente tesis.

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

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

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

A Daniel, por su apoyo incondicional, su desinteresada y constante colaboración y preocupación, su compañía y ayuda, sus consejos y por los gratos momentos vividos en el laboratorio.

A Mariana y Susana, por los gratos momentos compartidos y compañía, su generosidad y colaboración personal.

A Adrián, por su colaboración y su paciencia para escucharme.

A Isabel, por su eficaz colaboración en algunas experiencias y la ayuda brindada en la preparación de trabajos. A Irene, por la eficiencia en la preparación del material de laboratorio.

A mi madre, por su apoyo moral y su estímulo constante, a pesar de los difíciles momentos vividos y por cuidar de mis hijos. A mi hermana Coca y su esposo, por colaborar en diversas formas. A Omar, por su interés en mi trabajo. A Melina, que me brindó su ayuda durante la impresión de este trabajo.

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

A mis padres

A mis hermanos

A Sergio

A mis hijos: **Melina**

Ayelén

Alejandro

ABREVIATURAS

ATP	Trifosfato de adenosina
ATPasa	Adenosina trifosfatasa
DCCD	N N'-d ciclohexilcarbodiimida
DES	Dietilestilbestrol
DNP	2,4-dinitrofenol
Δ pH	Gradiente de pH
EDTA	Acido etilendiaminotetracético
FHK	Ftalato ácido de potasio
G	Tiempo de generación medio
GAP1	Permeasa general de aminoácidos
g ó g. ps	gramos de peso seco de células
$J_{\text{máx}}$	Velocidad máxima para el transporte del sistema
K_i	Constante de inhibición
K_T	Concentración de sustrato para alcanzar la mitad de la velocidad máxima del sistema transportador
LET1	gen estructural de la permeasa de alta afinidad del transporte de L-leucina
LET2	gen requerido para el transporte de L-leucina por la permeasa de baja afinidad
pHe	pH externo
pHi	pH interno
TFL	5,5,5 -trifluór-DL-leucina
TFL ^R	Resistencia de las células a la inhibición del crecimiento en presencia de TFL
Tris-HCl	Tris (hidroximetil) aminometano. HCl
v_i	Velocidad inicial de entrada

INDICE GENERAL

INDICE GENERAL

	Página
CAPITULO I: INTRODUCCION	1
I. 1. La levadura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> como modelo experimental	1
I. 2. Características de las células de levadura	2
I. 3. Transporte a través de la membrana plasmática	6
I. 4. Transporte de aminoácidos	8
I. 5. Regulación del transporte de aminoácidos	18
I. 6. Mecanismo de acoplamiento de energía en el transporte de aminoácidos	24
I. 7. Objetivos	27
CAPITULO II: MATERIALES Y METODOS	29
II. 1. Cepas	29
II. 2. Medios de cultivo y mantenimiento de las células	31
II. 3. Cultivo y condiciones de crecimiento	32
II. 4. Suspensión celular de trabajo	34
II. 5. Ensayo de incorporación de L- ¹⁴ C-aminoácidos de cadena ramificada	34
II. 6. Recuperación y análisis del ¹⁴ C acumulado en las células	34
II. 7. Determinación del contenido intracelular de aminoácidos libres	35
II. 8. Determinación de parámetros cinéticos	35
II. 9. Ensayos de inhibición del transporte de L- ¹⁴ C-aminoácidos	36
II. 10. Efecto del pH extracelular sobre el transporte de L- ¹⁴ C-leucina	36
II. 11. Determinación del pH intracelular	36
II. 12. Medida de la salida de protones	37
II. 13. Determinación de la radiactividad de las muestras	37
II. 14. Preparación de protoplastos	37
II. 15. Tratamiento osmótico	39
II. 16. Diseño experimental	39
II. 17. Origen y calidad de los reactivos	40

	Página
RESULTADOS	41
Capítulo III. Sistemas transportadores de L-leucina en	
<i>S. cerevisiae</i> cepas <i>gap1</i> y <i>MMY2/H3/LT1 gap1let1let2</i>	41
III. 1. Curvas de crecimiento	42
III. 2. Entrada e incorporación de L- ¹⁴ C-leucina	43
III. 3. Efecto de activadores e inhibidores metabólicos	48
III. 4. Parámetros cinéticos	49
III. 5. Especificidad	52
III. 6. Efecto del pH externo	54
III. 7. Determinación del pH intracelular	54
III. 8. Actividad de la H ⁺ -ATPasa	56
III. 9. Determinación del contenido intracelular de leucina	57
III. 10. Crecimiento celular en placa y transporte de aminoácidos	58
III. 11. Conclusiones	63
Capítulo IV. Sistemas transportadores de L-isoleucina y L-valina en las	
cepas <i>MMY2</i>, <i>MMY2/H3</i>, <i>KE3-R23</i>, <i>MMY2/H3/LT1</i> y <i>MMY2/LT1/GAP1</i>	66
IV. 1. Entrada e incorporación de L- ¹⁴ C-isoleucina y L- ¹⁴ C-valina	66
IV. 2. Análisis cinético del transporte de L-isoleucina y L-valina	86
IV. 3. Conclusiones	93
V. Sistemas transportadores de L-leucina en las tetradas	
obtenidas del cruce <i>KE3-R23</i> x <i>MMY2/H3/LT1</i>	94
V. 1. Entrada e incorporación de L- ¹⁴ C-leucina	94
V. 2. Parámetros cinéticos	102
V. 3. Especificidad de los sistemas transportadores	107
V. 4. Efecto del pH externo	112
V. 5. Efecto del dietiestilbestrol (DES)	114
V. 6. Requerimientos energéticos	115
V. 7. Determinación del contenido intracelular de aminoácidos libres	116
V. 8. Crecimiento celular en placa	117
V. 9. Conclusiones	120

	Página
Capítulo VI. Sistemas transportadores de L-isoleucina y L-valina en las tetradas obtenidas del cruce KE3-R23 x MMY2/H3/LT1	123
VI. 1. Entrada e incorporación de L- ¹⁴ C-isoleucina y L- ¹⁴ C-valina	126
VI. 2. Especificidad de los sistemas transportadores de L-isoleucina y L-valina	130
VI. 3. Análisis cinético del transporte de L-isoleucina y L-valina	134
VI. 4. Conclusiones	140
Capítulo VII. Relaciones entre los sistemas transportadores de L-leucina, L-isoleucina y L-valina	142
VII. 1. Cinéticas de inhibición	142
VII. 2. Regulación de la actividad de los sistemas transportadores S1 y S2	148
VII. 3. Conclusiones	153
DISCUSION	155
CONCLUSIONES	176
REFERENCIAS	178

INTRODUCCION

INTRODUCCION

	Página
I. 1. La levadura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> como modelo experimental	1
I. 2. Características de las células de levadura	2
I. 2. 1. Asimilación de carbono	2
I. 2. 2. Asimilación de nitrógeno	2
I. 2. 3. Ciclo de vida sexual de la levadura	4
I. 3. Transporte a través de la membrana plasmática	6
I. 3. 1. Estructura y función de la membrana plasmática	6
I. 3. 2. Diferentes clases de procesos de transporte	7
I. 4. Transporte de aminoácidos	8
I. 4. 1. Sistemas de transporte de aminoácidos en <i>S. cerevisiae</i>	9
I. 4. 2. Sistemas de transporte de L-leucina	14
I. 4. 3. Mutaciones pleiotrópicas que afectan la incorporación de aminoácidos	16
I. 5. Regulación del transporte de aminoácidos	18
I. 5. 1. Regulación de la síntesis de permeasas	18
I. 5. 2. Inactivación y represión catabólica por nitrógeno (NCI y NCR)	20
I. 5. 3. Transinhibición y retroinhibición	23
I. 5. 4. Compartimentalización intracelular de los aminoácidos	23
I. 6. Mecanismo de acoplamiento de energía en el transporte de aminoácidos	24
I. 6. 1. Hipótesis quimiosmótica	24
I. 6. 2. Cotransporte de aminoácidos, la función del potasio	26
I. 7. Objetivos	27

I. INTRODUCCION

I. 1. La levadura *Saccharomyces cerevisiae* como modelo experimental

Las levaduras son organismos eucariotas considerados ideales para estudios biológicos y bioquímicos. A diferencia de las bacterias, poseen cromosomas contenidos en un núcleo, mitocondrias, aparato de Golgi y retículo endoplasmático. De esta manera los procesos metabólicos son considerablemente similares a los observados en células de animales y plantas. Aunque las levaduras son genéticamente más complejas que las bacterias, comparten con éstas muchas de sus ventajas técnicas; los métodos cuantitativos desarrollados para bacterias, que permitieron por ejemplo un rápido progreso en la genética molecular de organismos procariotas han sido aplicados directamente a las levaduras.

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

Las propiedades que hacen a la levadura *S. cerevisiae* particularmente útil para estudios biológicos incluyen: su naturaleza unicelular, la sencillez en las técnicas de mantenimiento y cultivo de las células, al no ser patógenas son fáciles de manejar en el laboratorio, un rápido crecimiento, tanto en medios complejos como sintéticos con diferentes fuentes de carbono y de nitrógeno y con una elevada producción de biomasa, una fase de crecimiento exponencial prolongada y la relativa facilidad en el aislamiento de mutantes y su evaluación por plaqueo replicativo.

En *S. cerevisiae*, a diferencia de la mayoría de otros microorganismos, tanto la fase haploide como la fase diploide, tienen formas vegetativas estables e independientes. Su sistema genético facilita la aplicación de las técnicas de clonado de genes e ingeniería genética, los genes estructurales correspondientes a alguna característica genética pueden ser identificados por complementación utilizando bibliotecas de ADN contenidas en plásmidos. En las células de levadura, los plásmidos pueden ser introducidos como moléculas replicantes independientes del genoma o por integración al mismo. En este último caso las secuencias clonadas pueden ser dirigidas a una localización específica en el genoma reemplazando una secuencia normal de ADN. De esta forma genes normales pueden ser reemplazados por alelos mutados o portando una disrupción génica. En este último caso los fenotipos de las células han

contribuido al conocimiento de la función de ciertas proteínas *in vivo*. Estas técnicas han sido utilizadas en el análisis de la regulación, estructura y función de los genes. Las virtudes de este organismo como sistema modelo, se ponen de manifiesto por el hecho que los genes de mamíferos son introducidos en levaduras para el análisis sistemático de las funciones de sus productos.

I. 2. Características de las células de levaduras

I. 2. 1. Asimilación de carbono

Las levaduras son organismos heterótrofos capaces de utilizar carbohidratos y una amplia variedad de otros compuestos orgánicos como nutrientes. De todos estos compuestos derivan los esqueletos carbonados, necesarios para sintetizar los constituyentes celulares y para proveer la energía requerida por las reacciones bioquímicas. Glucosa, fructosa y manosa son utilizadas por más de 400 especies de levadura (Barnett, 1976).

Las levaduras del género *Saccharomyces* son anaeróbicas facultativas capaces de utilizar glucosa en condiciones aeróbicas o anaeróbicas. Durante el crecimiento aeróbico de *S. cerevisiae*, la respiración contribuye en menos del 10% en el catabolismo de la glucosa, que se refleja en una baja velocidad de consumo de oxígeno y una muy alta velocidad de consumo de glucosa (Gancedo y Serrano, 1989). En anaerobiosis la glucosa es metabolizada a etanol, pero el crecimiento celular es 10 veces menor que en condiciones aeróbicas.

El glicerol también puede ser utilizado como fuente de carbono bajo condiciones aeróbicas por *S. cerevisiae* (Barnett, 1976) pero en menor grado que la glucosa. En medio completo con 2% (v/v) de glicerol solamente es utilizado un 10% del mismo, y mucho menos en medio mínimo (Wills, 1990). El medio completo con glicerol es comúnmente usado para distinguir cepas normales de mutantes petite (deficientes respiratorias que carecen de citocromos), que no crecen sobre este medio.

I. 2. 2. Asimilación de nitrógeno

Las levaduras pueden utilizar una gran variedad de compuestos nitrogenados que captan de su entorno. Estas sustancias pueden ser usadas como fuente general de nitrógeno o proveer metabolitos para propósitos biosintéticos. La figura I. 1

esquematiza el destino de diferentes compuestos nitrogenados utilizados por *S. cerevisiae*.

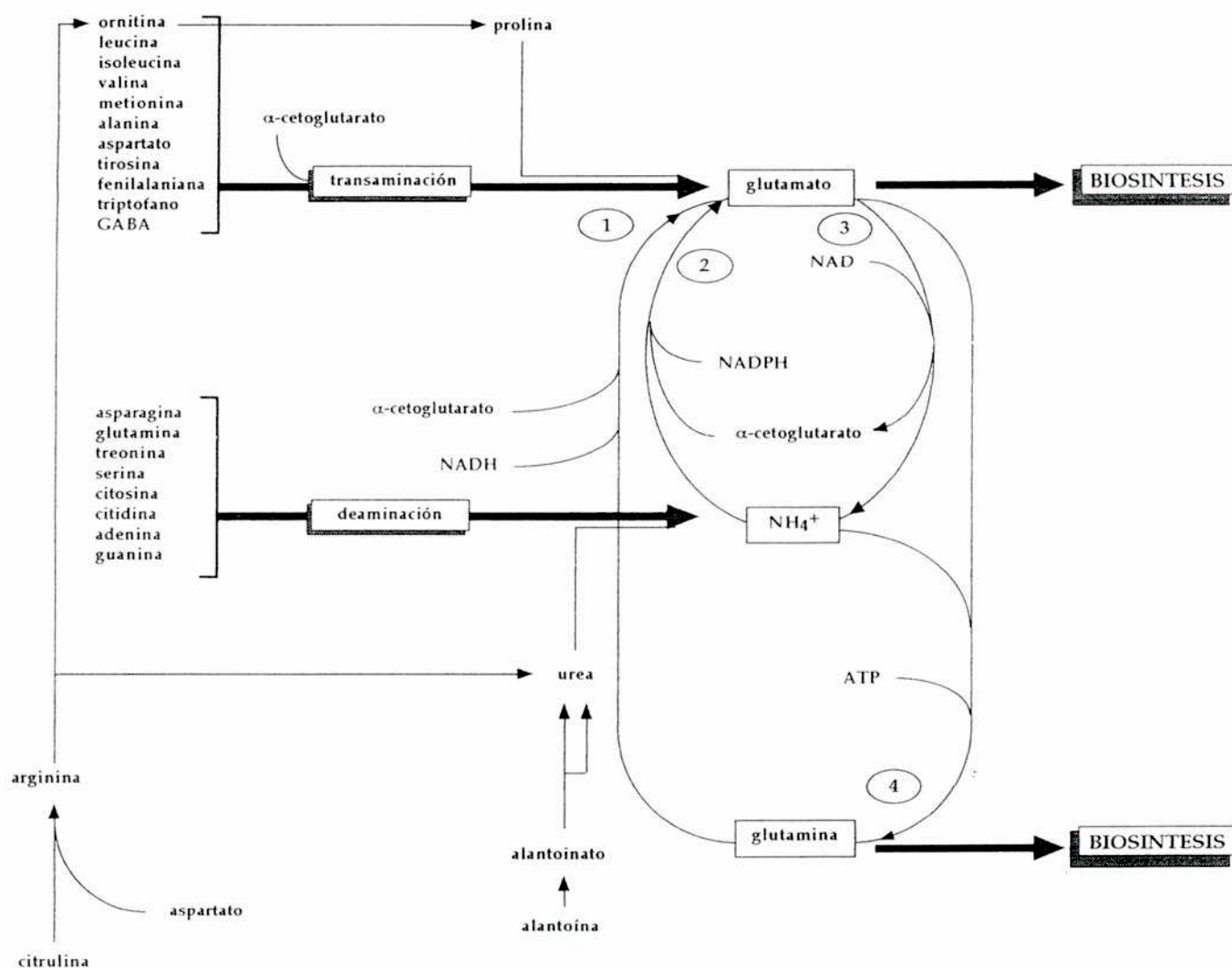


Figura I. 1: Esquema general de las principales reacciones involucradas en la utilización del nitrógeno en *Saccharomyces cerevisiae* crecida sobre una variedad de compuestos nitrogenados (Grenson, 1992). (1) glutamato sintetasa; (2) glutamato deshidrogenasa anabólica; (3) glutamato deshidrogenasa catabólica; (4) glutamina sintetasa.

Cuando los aminoácidos son utilizados como fuente general de nitrógeno su concentración intracelular es crucial, porque la mayoría de las enzimas que catalizan el primer paso de los caminos metabólicos tienen una baja afinidad por sus sustratos. La remoción enzimática del grupo α -amino por desaminación o transaminación produce iones amonio o glutamato, o ambos. El glutamato y los iones amonio, representan los productos mayores del catabolismo y son interconvertibles por la acción de las

glutamato deshidrogenasas anabólica y catabólica respectivamente. Los dadores finales de nitrógeno para biosíntesis son glutamato y glutamina, esta última formada a partir de glutamato, amonio y ATP por la acción de glutamina sintetasa.

La degradación de la arginina, la prolina y del γ -aminobutirato (GABA) han sido extensamente estudiados, cada uno de los cuales es inducible bajo condiciones específicas y todos sujetos a represión catabólica por nitrógeno (Grenson, 1992; Wiame y col., 1985).

Una característica que distingue el género *Saccharomyces* de otras levaduras, es su incapacidad para usar nitrato o nitrito como única fuente de nitrógeno. Otros compuestos como etilamina, cadaverina o lisina, son utilizados como diagnóstico para identificar especies de *Saccharomyces*, por ejemplo: *S. cerevisiae* no puede asimilar estos compuestos como fuente de nitrógeno, mientras que todos ellos pueden ser usados por *S.kluyven* y *S.unisporus* (Kreger-van Rij, 1984). Para *S. cerevisiae*, L-histidina no es una fuente catabolizable de nitrógeno y resulta tóxica en concentraciones mayores que 1,0 mM (Ljungdahl y col., 1992). En cambio los iones amonio son utilizados por todas las especies de levadura; por esta razón, es la fuente de nitrógeno de uso corriente en los laboratorios para la preparación de los medios de crecimiento.

S. cerevisiae puede utilizar como fuente de nitrógeno el grupo amino libre de la citosina y la adenina, pero no los átomos de nitrógeno presentes en los núcleos pirimidínicos y purínicos (Wiame y col., 1985). Los cuatro átomos de nitrógeno de la alantoína pueden usarse como fuente de nitrógeno luego de transformarse en dos moléculas de urea y una de ácido glioxílico (Cooper, 1982; Wiame y col., 1985). La degradación de la urea es compleja y catalizada por la enzima urea amidoliasa, en una reacción en dos pasos produciendo urea carboxilada, seguida de la hidrólisis de esta última produciendo iones amonio y dióxido de carbono (Cooper 1982; Wiame y col., 1985).

I. 2. 3. Ciclo de vida sexual de la levadura

Las levaduras presentan un ciclo de vida haploide-diploide (Figura I. 2). Las células haploides, denominadas a y α , se reproducen vegetativamente a lo largo de un ciclo mitótico típico por un proceso de gemación.

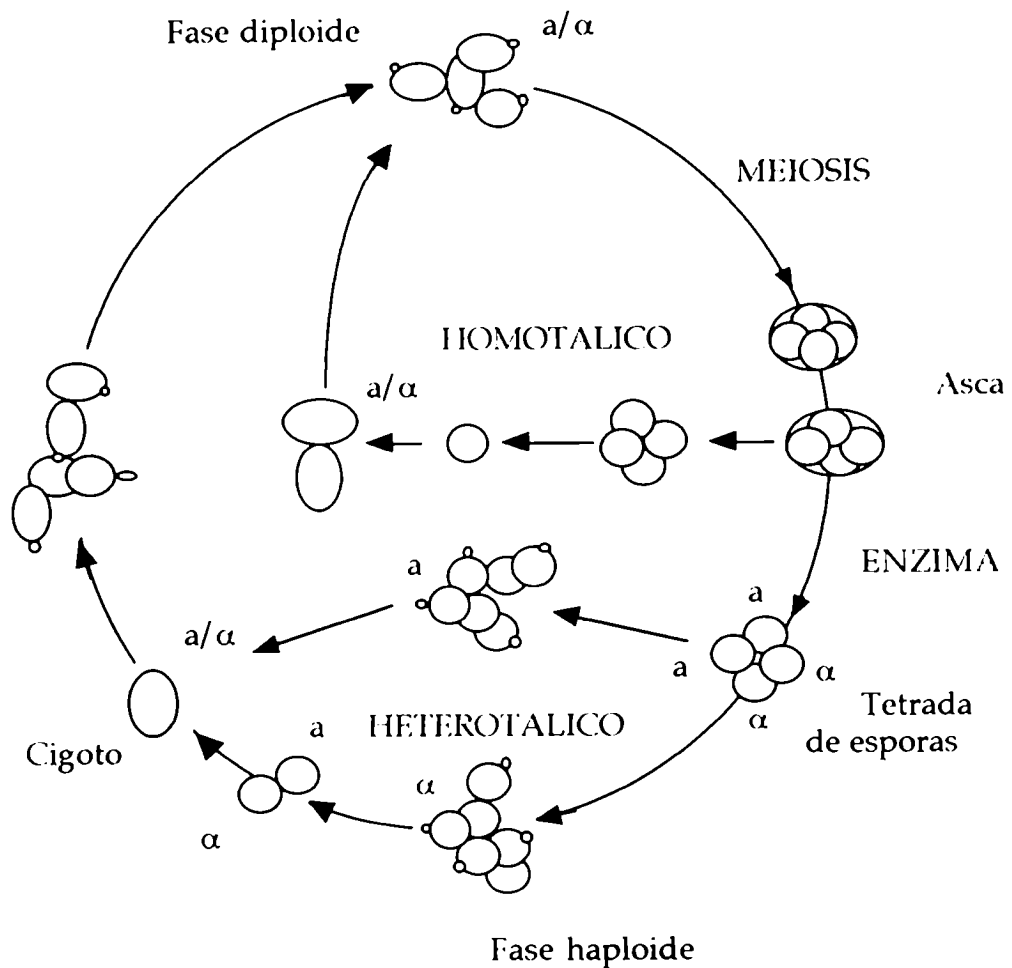


Figura I. 2. Ciclo de vida sexual de la levadura

Este ciclo de proliferación sólo se interrumpe en respuesta a dos tipos de estímulos ambientales. El primero de ellos es la ausencia de nutrientes en el entorno y el segundo es la presencia de células del tipo sexual opuesto, en este caso las células en fase G1 inician un proceso de conjugación que resulta en una fusión celular y nuclear para dar lugar a un individuo diploide a/α . Al igual que las formas haploides, estas células diploides en presencia de suficientes nutrientes pueden proliferar asexualmente por gemación hasta que en determinadas circunstancias, fundamentalmente cuando se enfrentan a una privación de fuente de nitrógeno, sufren una división reduccional (meiosis) originando cuatro ascosporas haploides incluídas en un asca, dos de cada tipo sexual, que en condiciones adecuadas germinan, completando el ciclo biológico. El genoma haploide de *S. cerevisiae* está constituido por 16 cromosomas que están siendo caracterizados tanto física como genéticamente.

I. 3. Transporte a través de la membrana plasmática

I. 3. 1. Estructura y función de la membrana plasmática

La capa más externa de la envoltura de la célula de levadura es la pared celular, que mantiene su estructura y rigidez y es libremente permeable a solutos más pequeños que 600 Da (Scherrer y col., 1974).

La membrana plasmática forma una bicapa lipídica de aproximadamente 7,5 nm de espesor y contiene una mezcla de lípidos polares y de proteínas que, por sus interacciones, gobiernan la estructura de la membrana. En el clásico modelo de Singer y Nicholson (1972), los lípidos no sólo difunden libremente dentro del plano de la membrana, sino que sufren movimientos transversales y de rotación. Las proteínas de la membrana no presentan movimiento lateral debido a la asociación con otras proteínas o con elementos del citoesqueleto o de la matriz extracelular. Tanto las proteínas como los lípidos están dispuestos asimétricamente a través de la membrana.

La composición de lípidos de la membrana plasmática es compleja y está altamente regulada. Varios autores han sugerido que los mismos desempeñan una función en la actividad de las proteínas de la membrana plasmática. Los principales lípidos que la componen son: glicerofosfolípidos, esfingolípidos y esteroides, estos últimos son rígidas moléculas hidrofóbicas compactas, con un grupo hidroxilo polar donde el ergosterol es el componente más abundante en contraste con eucariotas superiores donde el colesterol es el principal componente (van der Rest y col., 1995).

De esta manera, la membrana plasmática forma una barrera relativamente impermeable a las moléculas hidrofílicas. Proteínas especializadas median entonces la captación selectiva y/o secreción de solutos a través de la membrana, participando en la incorporación de varios nutrientes presentes en el medio externo: iones, azúcares, aminoácidos y vitaminas y controlando la liberación de etanol y una variedad de compuestos productos de la fermentación que son excretados al medio externo (Suomalainen, 1968).

El transporte de solutos en células de levadura ha sido estudiado desde 1930 (Collander y col., 1931), pero el mecanismo del proceso de transporte de solutos cobró impulso después de las propuestas de la teoría quimiosmótica de Mitchell (1963). Se han estudiado en detalle algunos de los mecanismos que participan en el transporte mediado por la membrana plasmática, sitios específicos de unión para ciertos sustratos

o grupos de compuestos estructuralmente relacionados. Estos sitios de unión corresponden a sistemas transportadores, permeasas o transportadores, cuyas actividades tienen los rasgos característicos de enzimas.

I. 3. 2. Diferentes clases de procesos de transporte

Puesto que los nutrientes tienen que entrar en la célula a través de la membrana, las propiedades de permeabilidad de dicha membrana son importantes en la nutrición celular. Básicamente hay tres clases de procesos de transporte de solutos a través de membranas biológicas: difusión simple, difusión facilitada y transporte activo.

La difusión simple, es gobernada por la ley de acción de masas y la molécula de soluto pasa a través de los dominios lipídicos de la membrana sin la participación de una proteína transportadora, depende del tamaño de la molécula y de su solubilidad lipídica, el proceso no es saturable con respecto a la concentración de sustrato, no es selectivo y no es afectado por la temperatura ni por inhibidores metabólicos. La difusión simple es raramente observada como medio de transporte de solutos en levadura y ha sido descrita para el transporte de dióxido de azufre (Stratford y Rose, 1986).

La difusión facilitada es una variación de la difusión simple donde una proteína transportadora de membrana participa en el proceso. Por consiguiente éste es saturable con respecto a la concentración de sustrato, muestra especificidad y estereoespecificidad de sustrato, sustratos que usan sitios de unión comunes compiten unos con otros de acuerdo a sus afinidades. La velocidad de transporte depende de la temperatura y como el soluto no es concentrado intracelularmente, no es un proceso sensible a inhibidores metabólicos ya que no depende de energía. Este tipo de transporte ha sido descrito para hidratos de carbono (Cartwright y col., 1989).

El transporte activo es la forma más frecuente de incorporación de solutos en levadura, y como en el caso de la difusión facilitada es mediado por una proteína transportadora, la característica distintiva es el requerimiento de energía metabólica, que hace posible la acumulación de metabolitos contra gradiente de concentración y por lo tanto, es sensible a inhibidores metabólicos. En *S. cerevisiae*, aminoácidos, amonio, urea, alantoína, purinas, pirimidinas, iones y vitaminas son transportados activamente (Cartwright y col., 1989; Cooper, 1982; Horák, 1986, 1997).

I. 4. Transporte de aminoácidos

En microorganismos eucariotas, los sistemas de transporte de aminoácidos comparten características tanto de los sistemas bacterianos, como de los sistemas de células de mamíferos. Los primeros son altamente específicos para un dado aminoácido o un reducido grupo de aminoácidos estructuralmente relacionados, mientras que los segundos son de amplia especificidad.

Los microorganismos eucariotas entonces, poseen generalmente dos tipos de sistemas de transporte de aminoácidos: sistemas específicos para un aminoácido o un grupo de aminoácidos estructuralmente relacionados y sistemas generales que transportan un gran número de aminoácidos.

Sin embargo, los sistemas de transporte de los microorganismos eucariotas difieren de los sistemas bacterianos y de los de células de mamíferos en por lo menos dos aspectos: median un flujo prácticamente unidireccional del medio externo al interior de la célula y sus actividades se regulan por un mecanismo de retroinhibición (Grenson, 1992; Horák, 1986, 1997).

En *S. cerevisiae*, la unidireccionalidad en la incorporación y acumulación de los aminoácidos, determina la irreversibilidad del proceso, ya que no se produce salida ni desplazamiento del aminoácido previamente acumulado por su permeasa específica (Crabeel y Grenson, 1970; Grenson, 1992; Ramos y col., 1975), siendo la única excepción L-prolina que puede ser intercambiada por prolina externa (Horák y Rihová, 1982).

En levaduras, la excreción de aminoácidos al medio externo sólo ocurre bajo determinadas condiciones y cuando estos son sobreproducidos por encima de un determinado umbral, por ejemplo: una alterada regulación de biosíntesis de aminoácidos; por mutaciones que evitan el catabolismo del sustrato; cuando el crecimiento ocurre en presencia de intermediarios metabólicos ó cuando el crecimiento es detenido en condiciones donde continúa la biosíntesis de aminoácidos (Grenson, 1973). Las permeasas no están directamente involucradas en la salida de sus sustratos y la misma, es mediada por mecanismos diferentes de los sistemas de transporte caracterizados (Grenson, 1973,1992).

I. 4. 1. Sistemas de transporte de aminoácidos en *S. cerevisiae*

El número de sistemas de transporte en la membrana plasmática es sorprendentemente alto. En muchos casos, un sustrato es transportado por varias permeasas con diferentes afinidades, especificidades, capacidades y regulaciones.

Algunos aminoácidos son transportados por dos permeasas: un transportador específico y una permeasa general de aminoácidos (GAP1), pero otros son transportados por dos y hasta tres sistemas específicos con muy diferentes valores de K_T y $J_{m\acute{a}x}$. Los transportadores de alta afinidad permiten a las células recolectar trazas de aminoácidos del medio de cultivo que resultan sumamente útiles para suplir una auxotrofia para un cierto aminoácido.

Por lo tanto, esta multiplicidad y diversidad de transportadores le permiten a la levadura acumular aminoácidos para biosíntesis y catabolismo bajo una amplia variedad de condiciones y en un amplio rango de concentraciones externas.

La regulación de los sistemas de transporte es tal, que sólo algunos están presentes en forma permanente, son las permeasas constitutivas mientras que otros sólo se desarrollan bajo ciertas condiciones son los sistemas adaptativos o inducibles.

A partir de análisis cinéticos y/o genéticos se han caracterizado al menos 12 sistemas de transporte de aminoácidos constitutivos y 4 sistemas adaptativos (Horák, 1986). Algunos de los genes que codifican estos sistemas han sido clonados y deducida la secuencia de aminoácidos, todas contienen 12 estructuras de α -hélice transmembrana, característica distintiva de las permeasas (Tabla I. 1).

La idea de un sistema de transporte que acumula todos los aminoácidos fue originada en los trabajos de Halvorson y Cohen (1958). Surdin y col. (1965), mostraron que la acumulación de un gran número de aminoácidos era dependiente de la expresión de un único sistema de transporte. Pero Grenson y col. (1970), fueron quienes presentaron evidencias cinéticas y genéticas de la presencia de una permeasa general de aminoácidos en *S. cerevisiae*. Estos autores encontraron que en medio mínimo amonio, mutantes resistentes a canavanina, análogo tóxico de arginina, designadas *can1*, recobraban la sensibilidad a canavanina cuando las células crecían en un medio conteniendo una fuente pobre de nitrógeno, como L-prolina. A partir entonces de la mutante *can1*, fueron aisladas dobles mutantes *can1gap1*, resistentes a canavanina sobre medio con prolina. La mutación *gap1* produce una disminución en la

Tabla I. 1. Genes de permeasas de L-aminoácidos clonados y secuenciados *

Gen	Cromo soma	Amino ácidos	Referencia	Permeasa	K_T (μM)	$J_{\text{máx}}$ ($\text{nmol min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{prot}$)
<i>HIP1</i>	VII	603	Tanaka y Fink, (1985)	histidina	20	11
<i>CAN1</i>	V	590	Hoffmann, (1985)	arginina	10	23
				lisina	170	17
<i>LYP1</i>	XIV	611	Sychrová y Chevallier, (1993)	lisina	25	8
<i>PUT4</i>	n.d	627	Vandenbol y col., (1990)	prolina 4-aminobutirato (adaptativa)	31	40 ^a
<i>TAT2</i>	XV	592	Schmidt y col., (1994)	triptofano		
<i>TAT1</i>	II	619	Schmidt y col., (1994)	tirosina triptofano		
<i>GNP1</i>	IV	663	Zhu y col., (1996)	glutamina	590	16 ^a
<i>DIP5</i>	XVI	609	André, (1995)	aminoácidos dicarboxílicos	30	40
<i>UGA4</i>	n.d	571	André y col., (1993)	4-aminobutirato (inducible)		
<i>GAP1</i>	XI	602	Jauniaux y Grenson, (1990)	general de aminoácidos (adaptativa)		
				L-arginina	7,6	
				L-lisina	3,1	
				L-triptofano	9-13	
				L-glutamato	1000	20 ^a
				D-histidina	25	16
				D-serina	500	
L-ornitina	4					

* André, (1995) y Horák, (1986,1997).

^a $J_{\text{máx}}$ expresada en nmol / min por mg de peso seco.

capacidad de transporte de aminoácidos básicos y neutros cuando las células son crecidas con prolina como fuente de nitrógeno. Una disminución similar en la velocidad de transporte, en una cepa normal, fue observada cuando prolina era reemplazada por iones amonio. Grenson y col. (1970), concluyeron que *S. cerevisiae* posee una permeasa general de aminoácidos, GAP1, cuya actividad es inhibida por iones amonio. Como las velocidades de transporte de aminoácidos ácidos y de prolina no se afectaron por la mutación *gap1*, los autores propusieron que estos sustratos probablemente no eran transportados por la GAP1. Sin embargo, estudios posteriores demostraron que la GAP1 es capaz de transportar todos los aminoácidos, incluyendo glutamato y aspartato (Darte y Grenson, 1975), prolina (Lasko y Brandriss, 1981) y γ -aminobutirato (GABA) (Grenson y col., 1987). Este sistema puede también transportar los D-enantiómeros (Rytka, 1975), característica que lo distingue de los sistemas de transporte específicos que tienen una marcada preferencia por los L-isómeros de los aminoácidos. La GAP1 es el principal transportador de glicina, alanina, fenilalanina, triptofano y tirosina (Cooper, 1982; Greasham y Moat, 1973), de análogos tóxicos de aminoácidos y de intermediarios en la biosíntesis de aminoácidos como citrulina y ornitina (Grenson y col., 1970).

La existencia de sistemas de transporte específicos en *S. cerevisiae* fueron descritos por primera vez por Grenson y col. (1966), en células en crecimiento exponencial en un medio conteniendo iones amonio y glucosa. Estos autores encontraron que la incorporación de L-arginina es mediada por un sistema de alta afinidad con un $K_T = 10 \mu\text{M}$, que es inhibido competitivamente por D-arginina, L-canavanina, L-lisina y L-ornitina y por lo tanto constituiría un sistema de transporte de todos los aminoácidos básicos. La selección de mutantes resistentes a canavanina (análogo tóxico de arginina), con una velocidad de transporte de L-arginina muy reducida confirmó que el producto de un único gen *CAN1* constituye el sistema funcional de transporte de los aminoácidos básicos.

Además de este sistema de alta afinidad, Chan y Cossins (1976) y Keenan y Rose (1979) describieron un sistema de transporte de arginina de baja afinidad con un $K_T = 1 \text{ mM}$ (Chan y Cossins, 1976) pero sin determinar su especificidad.

El transporte de L-lisina es también mediado por dos sistemas distintos (Grenson, 1966; Keenan y col., 1982; Kotyk y col., 1971). El sistema de baja afinidad ($K_T = 200 \mu\text{M}$)

es el codificado por el gen *CAN1* ya que está ausente en mutantes *can1*. El sistema de alta afinidad ($K_T = 25 \mu\text{M}$) es específico para lisina, producto del gen *LYP1*, y no es detectado en mutantes *lyp1*, aisladas como resistentes al análogo tóxico de L-lisina, L-tiosina, que presentan una reducción de 50 veces en el transporte de L-lisina (Grenson, 1966).

Crabell y Grenson (1970), demostraron que la incorporación de L-histidina se efectúa por dos sistemas diferentes de transporte al obtener un gráfico bifásico de Lineweaver-Burk. El sistema de alta afinidad ($K_T = 20 \mu\text{M}$) es específico para L-histidina y una mutante designada *hip1*, aislada por selección de una auxótrofa de histidina, incapaz de crecer cuando el medio de cultivo se suplementa con bajas concentraciones de histidina, presenta una reducción de 10 veces en la capacidad del sistema de alta afinidad. La actividad del sistema de baja afinidad ($K_T = 500 \mu\text{M}$) no es afectado por la mutación *hip1* y es inhibido competitivamente por L-tirosina, pero no por L- triptofano o L-fenilalanina. Sin embargo, los datos cinéticos de Calderbank y col. (1984) se ajustan mejor a un modelo que consiste en un sistema de transporte de alta afinidad y un componente de difusión. Una explicación alternativa fue propuesta por Cooper (1982), ya que histidina inhibe la actividad del sistema de aminoácidos básicos en forma mixta, sugirió que este transportador podría ser responsable del transporte de histidina con baja afinidad.

Gits y Grenson (1967) y Kotyk y col. (1971), demostraron la existencia de dos componentes para el transporte de L-metionina, uno de alta afinidad ($K_T = 3-12 \mu\text{M}$) y el otro de baja afinidad ($K_T = 0,6-0,8 \text{ mM}$). Los únicos sustratos del sistema de alta afinidad son probablemente L- y D-metionina y sus análogos, L-etionina y DL-selenometionina. La mutación *mtp1(metp1)* que inactiva este sistema es recesiva y fue aislada por la resistencia de las células a la acción inhibitoria sobre el crecimiento de L-etionina (Gits y Grenson, 1967). El sistema de transporte de metionina de baja afinidad, funcional en la mutante *mtp1*, presenta la misma especificidad de sustrato que el de alta afinidad y es sensible a la acción inhibitoria de L-serina y L-treonina (Gits y Grenson, 1967).

Sin embargo, Verma y col. (1984), demostraron que *S. cerevisiae* tiene un sistema de transporte de L-serina específico e inducible por serina, cuya actividad depende del estado del metabolismo celular del nitrógeno y, además cepas con y sin el sistema

GAP1 funcional, presentan similares velocidades de acumulación de L-serina. Por otra parte, Calderbank y col. (1984), indicaron que L-serina y L-treonina son transportados por sistemas únicos aunque no necesariamente idénticos con valores de K_T de 0,58 y 0,21 mM respectivamente. La posibilidad que estos dos aminoácidos químicamente relacionados podrían no compartir el mismo translocador, fue sugerida por Gregory y col. (1982), debido a que la incorporación de L-asparagina es inhibida competitivamente por L-treonina pero no por L-serina.

El sistema de transporte de L-cisteína no se relaciona con ninguno de los dos sistemas de transporte de L-metionina. Kotyk y col. (1971), midieron un valor de $K_T = 0,25$ mM, posteriormente Ono y Naito (1991), determinaron un valor de $K_T = 83$ μ M siendo inhibido competitivamente por homocisteína y no competitivamente por L-metionina. El sistema de transporte de cisteína fue desreprimido solamente cuando las células se incuban sin fuente de azufre.

El transporte de aminoácidos dicarboxílicos en *S.cerevisiae* involucra al menos dos sistemas cinéticamente distintos y relativamente específicos (Kotyk y col., 1971). Darté y Grenson (1975), identificaron tres sistemas de transporte para la incorporación de glutamato, uno de ellos es altamente específico y constitutivo para aminoácidos ácidos (aspartato, glutamato y α -aminoadipato) con un valor de $K_T = 30$ μ M para el transporte de glutamato (Darté y Grenson, 1975; Joiris y Grenson, 1969); otro sistema transporta aspartato, glutamato, alanina, además de asparagina y glutamina (Grenson y Dubois, 1982) siendo posiblemente el sistema GAP1 (Cartwright y col., 1989) y un tercer sistema de transporte de glutamato con un $K_T = 112$ μ M cuya actividad y/o síntesis es regulada por la fuente de nitrógeno presente en el medio de cultivo (Darté y Grenson, 1975).

Calderbank y col. (1984), determinaron las características cinéticas de dos sistemas de transporte de aminoácidos dicarboxílicos detectables en células creciendo en presencia de amonio, con K_T de 20 μ M y 3,3 mM para la incorporación de glutamato, pero se desconoce si estos dos sistemas están relacionados a los descritos por Darté y Grenson (1975).

Un sistema relativamente específico para asparagina y glutamina ($K_T = 350$ μ M y 440 μ M respectivamente) y capaz también de transportar treonina, histidina, triptofano y probablemente serina, pero no aspartato, fue descrito por Gregory y col. (1982).

Grenson y Dubois (1982), demostraron que además del sistema de transporte específico descrito por Gregory y col. (1982), existe un sistema de baja afinidad que transporta glutamina y asparagina que corresponde a uno de los translocadores de aminoácidos dicarboxílicos.

Magaña-Schwencke y Schwencke (1969), fueron los primeros en estudiar la cinética del transporte de prolina en *S. cerevisiae* (*S. chevalieri*). Estos autores demostraron que en condiciones de ayuno de nitrógeno las células acumulan L-prolina a través de un sistema de transporte específico ($K_T = 25 \mu\text{M}$). Este sistema no se detecta en células creciendo en una fuente rica de nitrógeno (amonio, glutamina y asparagina). El sistema es específico para L- y D-prolina y L-alanina y es competitivamente inhibido por análogos estructurales de L-prolina: L-azetidina 2-carboxilato, sarcosina y 3,4 dehidro DL-prolina (Magaña-Schwencke y Schwencke, 1969; Magaña-Schwencke y col., 1973). Lasko y Brandriss (1981), aislaron mutantes *put4* defectivas en el sistema de alta afinidad de prolina, sin embargo, subsiste un transporte residual de prolina por uno o más sistemas de baja afinidad competitivamente inhibido por L-histidina. Parte de esa actividad es mediada por el sistema GAP1, ya que la mutación *gap1* no inactiva completamente el transporte de prolina de baja afinidad. Copper (1982) sugirió también la participación del sistema de transporte de aminoácidos básicos. Más recientemente, Grenson y col. (1987) presentaron evidencias cinéticas y genéticas, que el γ -aminobutirato es transportado por el sistema PUT4 con alta afinidad.

Varios estudios mostraron que en la incorporación de alanina y glicina están involucrados dos componentes cinéticamente distintos (Ballarin-Denti y col., 1984; Calderbank y col., 1985; Eddy y col., 1970b; Kotyk y Rihová, 1972). La GAP1 es responsable de la incorporación de estos aminoácidos con alta afinidad, pero se desconoce la especificidad y la función fisiológica del sistema de baja afinidad.

I. 4. 2. Sistemas de transporte de leucina

En *S. cerevisiae* (Ramos y col., 1977, 1979, 1980; Stoppani y Ramos, 1978) y *S. carlsbergensis* (Wainer y col., 1988) han sido descritos dos sistemas de transporte de L-leucina, en células crecidas en medios complejos.

Un sistema de alta afinidad y baja velocidad máxima denominado S1, opera preferentemente a bajas concentraciones externas de L-leucina, y otro sistema, de baja afinidad y alta velocidad máxima opera preferentemente a altas concentraciones de L-leucina.

Los sistemas S1 y S2 están caracterizados por sus parámetros cinéticos K_T y $J_{m\acute{a}x}$ siendo este último, dependiente del estado metabólico de las células.

Estos sistemas pueden caracterizarse en protoplastos preparados a partir de células enteras, sin modificación en los valores de K_T (Kotliar y Ramos, 1983), lo que sugiere que las entidades relacionadas con la afinidad de los sistemas están localizadas en la membrana plasmática.

En el estudio de los requerimientos energéticos de la incorporación de L-leucina se demostró que los sustratos capaces de activar la transferencia mitocondrial de electrones y la fosforilación oxidativa, estimulan el transporte concentrativo y la acumulación del aminoácido (Ramos y col., 1975, 1977; Stoppani y Ramos, 1978).

Ensayos realizados con cepas silvestres y mutantes deficientes respiratorias, permitieron distinguir el aporte energético mitocondrial del citoplasmático, y estudiar el efecto de protonóforos, de inhibidores metabólicos y de la H^+ -ATPasa de membrana plasmática (Ramos y col., 1975, 1977, 1980; Stoppani y Ramos, 1978).

Además, la directa proporcionalidad entre el grado de inhibición del transporte de L-leucina por agentes alquilantes, y las velocidades de su penetración a través de la membrana plasmática de *S. cerevisiae*, excluyeron la posibilidad que grupos sulfhidrilos de los sistemas de transporte de leucina estuvieran expuestos sobre la superficie externa de la membrana plasmática (Ramos y col., 1983).

Estudios sobre el pH_i y el ΔpH en diferentes condiciones metabólicas, sugirieron que no hay una relación estricta entre el ΔpH y el transporte de L-leucina en *S. cerevisiae*: en general a mayor ΔpH a través de la membrana se verificó un aumento en la velocidad de transporte por cada uno de los sistemas (Bongioanni y Ramos, 1988).

Por otra parte, Grenson y col. (1970), demostraron que en células crecidas con prolina como fuente de nitrógeno, el transporte de L-citrulina, que utiliza el sistema GAP1 exclusivamente, fue inhibido por L-leucina.

Posteriormente, Kotliar y col. (1990, 1994), utilizando la cepa silvestre de *S. cerevisiae* MMY2 y su mutante isogénica MMY2/H3 *gap1*, crecidas en diferentes medios

de cultivo, establecieron la participación de los sistemas GAP1, S1 y S2 en el transporte de L-leucina, a partir de sus parámetros cinéticos, especificidades y sensibilidades a la fuente de nitrógeno presente en el medio de crecimiento. Stella y col. (1992), estudiaron las actividades de los tres sistemas en relación con la concentración intracelular de protones y el ΔpH a través de la barrera de permeabilidad.

Con respecto a la especificidad de los sistemas S1 y S2, éstos son fuertemente inhibidos por L-isoleucina, L-valina y L-norleucina, aminoácidos estructuralmente relacionados con L-leucina (Kotliar y col., 1994). Sin embargo, debido a la superposición de las actividades de los sistemas S1 y S2, la especificidad de sustrato de cada sistema no pudo ser estudiada en más detalle y otros autores asumieron tácitamente que L-isoleucina y L-valina son también sustratos de estos sistemas.

En *Schizosaccharomyces pombe* Sychrová y col. (1989), mostraron que el transporte de L-leucina es mediado por dos sistemas en células crecidas en medio complejo YPD. El sistema de alta afinidad es inhibido competitivamente por L-isoleucina, L-valina, L-fenilalanina y L-cisteína.

Por otra parte, las propiedades del transporte de L-isoleucina y L-valina en *S. cerevisiae* han sido poco estudiadas. El transporte de L-valina exhibe dos componentes, siendo uno de ellos el sistema GAP1 (Ferrerías y col., 1989). Tullin y col. (1991), identificaron un sistema de alta afinidad, denominado BAP1, que transportaría los aminoácidos de cadena ramificada en condiciones de represión de la GAP1. En mutantes *bap1* operan sistemas de baja afinidad para el transporte de estos aminoácidos.

I. 4. 3. Mutaciones pleiotrópicas que afectan el transporte de aminoácidos

Aunque desde un punto de vista cinético, los sistemas de transporte de aminoácidos en *S. cerevisiae* parecerían operar independientemente unos de otros, hay evidencias que sugieren que podrían tener elementos en común.

Sorsoli y col. (1964), aislaron una mutante cuyo crecimiento no fue inhibido por altas dosis de los análogos de metionina o fenilalanina, etionina o p-flúorfenilalanina respectivamente. En esta cepa la incorporación de metionina, leucina y serina disminuyó. La naturaleza pleiotrópica de esta mutación recesiva, fue puesta de manifiesto por una disminución de 40 veces en la incorporación de un hidrolizado de

algas radiactivo. Una mutación similar designada *aap1* fue descrita por Surdin y col. (1965) y las cepas *aap1* fueron resistentes a los efectos inhibitorios de etionina, canavanina, tienilalanina y p-flúorfenilalanina. En 1971 Grenson y Hennaut, aislaron una mutante designada *apf1* con el mismo fenotipo, resistente a la inhibición del crecimiento por tiosina, D-norleucina, L-azetidina 2-carboxilato, cicloleucina y cicloserina además de los otros análogos ya mencionados. Esta mutante, en contraste con una cepa normal, puede usar glicina como fuente de nitrógeno pero no prolina. El crecimiento fue lento cuando glutamato, aspartato, valina, triptofano, fenilalanina o serina fueron usadas como fuentes de nitrógeno. La mutación *apf1* es alélica a la *aap1* y afecta pleiotrópicamente la actividad de la GAP1 y de varias permeasas específicas (arginina, lisina, histidina, glutamato, leucina, metionina, serina, valina y prolina) que presentan una reducida $J_{m\acute{a}x}$ pero sin variar el valor de K_T , mientras que la incorporación de pirimidinas y adenina es normal. Por lo tanto, distintos sistemas de transporte de aminoácidos poseen un factor común para el desarrollo de su actividad normal.

Horák y Kotyk (1993), realizaron un análisis funcional de la mutación *apf1* mostrando que ni el potencial de membrana o el ΔpH fueron afectados, tampoco encontraron cambios en el contenido intracelular de ATP y en la actividad de la H^+ -ATPasa medida por su capacidad de hidrolizar ATP y extruir protones. En forma independiente Ljungdahl y col. (1992), aislaron la mutante *shr3* (resistente a altas dosis de L-histidina), alélica a la mutante *apf1*. El gen *SHR3* fue clonado y secuenciado y a partir de datos cinéticos, genéticos y de inmunofluorescencia, mostraron que la proteína SHR3 es una proteína integral del retículo endoplasmático y que su interacción con dominios estructurales de las permeasas de aminoácidos son necesarios para el procesamiento y transporte efectivo de las mismas desde el retículo endoplasmático a la membrana plasmática. Por consiguiente, defectos asociados con mutaciones en el locus *APF1/SHR3* producen la reducción de proteínas de transporte de aminoácidos en la membrana plasmática, como consecuencia de su defectiva translocación desde el retículo endoplasmático a la membrana plasmática.

Roon y col. (1977 a y b), aislaron mutantes denominadas *amt*⁺ defectivas en el transporte de amonio y aminoácidos (triptofano, alanina y prolina) y que crecen pobremente con glutamina como fuente de nitrógeno. El hallazgo que esta mutación afecta tanto a la GAP1 y a ciertos sistemas específicos sugirió la posibilidad que

diferentes permeasas compartan uno o más componentes estructurales y propusieron que la mutación *amt*⁺ podría restringir el acople de energía metabólica para la incorporación de esos sustratos.

Banerjee y col. (1984), aislaron una mutante de *S. cerevisiae* termosensible, que a la temperatura restrictiva es defectiva pleiotrópicamente en el transporte de aminoácidos. La incapacidad de esta mutante para acumular aminoácidos se debe a una disminución en la actividad de la fosfofructoquinasa (PFK). Esta deficiencia produce una disminución en la formación de ATP, que lleva a una disminución en la actividad de los sistemas que dependen de energía. No se puede descartar que un fenómeno similar sea el responsable del comportamiento de la mutante *amt*⁺

I. 5. Regulación del transporte de aminoácidos

Los sistemas de transporte de aminoácidos de microorganismos eucariotas están controlados y modulados por diferentes tipos de sistemas de regulación, que pueden agruparse en dos niveles distintos: 1) a nivel de la expresión de los genes estructurales y de la síntesis de las permeasas y 2) a nivel de sus actividades. Mientras la represión y la inducción son, probablemente, los únicos mecanismos de regulación del primer tipo, en el segundo caso los mecanismos abarcan la inactivación, la transinhibición, la retroinhibición y la regulación que se ejerce por compartimentalización intracelular de los nutrientes incorporados (Horák, 1986).

I. 5. 1. Regulación de la síntesis de permeasas

En *S. cerevisiae*, la síntesis de permeasas de aminoácidos es controlada por varios procesos regulatorios, algunos de los cuales son generales y otros más específicos.

La expresión de genes de permeasas puede ser constitutiva (que ocurre sin la adición de un efector exógeno) como es el caso de la mayoría de las permeasas de aminoácidos y de la permeasa de ureidosuccinato-alantoato UEP1/DAL5 o inducible (dependiente de una molécula efectora inductora) como la permeasa UGA4, específica para el ácido γ -aminobutírico (GABA) (Grenson, 1992).

Un mecanismo regulatorio general denominado represión catabólica por nitrógeno (NCR), opera en células crecidas en fuentes ricas de nitrógeno (amonio, asparagina y

glutamina) y controla la síntesis de un cierto número de permeasas tanto constitutivas como inducibles (Grenson, 1992) y se comenta en la sección I. 5. 2.

Los transportadores específicos de aminoácidos como la permeasa de arginina, CAN1 (Grenson y col., 1966); la permeasa de lisina, LYP1 (Grenson, 1966); la permeasa de metionina, MTP1 (Gits y Grenson, 1967) y la permeasa de arginina, HIP1 (Crabeel y Grenson, 1970) son insensibles a la NCR y son sintetizadas en células creciendo en medio mínimo conteniendo iones amonio sin la adición de ningún inductor.

Para estudiar los procesos regulatorios diferentes de la NCR, es decir la regulación específica de la síntesis constitutiva o inducible de los transportadores sensibles a la NCR, las células de *S. cerevisiae*, son crecidas con prolina o urea como única fuente de nitrógeno, en ausencia de NCR.

Algunos de los aspectos del mecanismo de síntesis constitutiva de las permeasas GAP1, PUT4 y UEP1/DAL5 fueron estudiadas por varios autores (Bysani y col., 1990; Jauniaux y Grenson, 1990; Rai y col., 1989; Vandebol y col., 1989). Ellos identificaron en las secuencias de DNA 5' proximal de estos genes dos pequeñas regiones de un pentanucleótido 5'-GATAA-3' requeridas para su óptima expresión y que son esenciales para la actividad UAS (upstream activating sequences). La expresión constitutiva del gen *UEP1/DAL5*, requiere del producto del gen *GLN3*. Mutantes *gln3* presentan bajos niveles de glutamina sintetasa y tienen también niveles más bajos de otras enzimas del metabolismo del nitrógeno (Cooper y col., 1990; Mitchell y Magasanick, 1984). El comportamiento de estas mutantes sugirió que *GLN3* podría ser un activador pleiotrópico de la expresión de varios genes que participan en el metabolismo del nitrógeno. El análisis molecular del gen *GLN3* reveló que la proteína contiene una región rica en residuos de cisteína con propiedades *in vitro* de unión al DNA y que probablemente se une a las secuencias UAS GATAA de varios genes de permeasas (Stanbrough y Magasanick, 1996).

La permeasa UGA4 de *S. cerevisiae*, específica para GABA es inducible (Grenson y col., 1987) y es coinducida con las enzimas catabólicas del GABA: GABA transaminasa (UGA1) y succinato semialdehído deshidrogenasa (UGA2). El proceso de inducción se demostró a nivel del RNAm, por la acumulación de los genes transcriptos *UGA4* y *UGA1* después de la adición de GABA a células en crecimiento (André, 1990).

En la síntesis inducida de los productos de los tres genes participan distintas combinaciones de proteínas regulatorias positivas y negativas, específicas y pleiotrópicas (André, 1990; André y Grenson, 1990; Coornaert y col., 1991; Ramos, F. y col., 1985; Vissers y col., 1989, 1990). El producto del gen regulatorio, *UGA43*, ejerce un control negativo sobre la expresión de la permeasa *UGA4* y mutaciones en el mismo hacen constitutiva la expresión de la permeasa *UGA4* (Vissers y col., 1989).

I. 5. 2. Inactivación y represión catabólica por nitrógeno (NCI y NCR)

La permeasa *GAP1*, exhibe la mayor actividad en células crecidas en una fuente pobre de nitrógeno como prolina o urea, y no es activa en células crecidas con iones amonio (Grenson y col., 1970). Esta situación es el resultado de un doble control que involucra: la inhibición de la actividad de la permeasa (NCI) y la represión de su síntesis (NCR). Estos mecanismos regulatorios pueden perderse separadamente como resultado de mutaciones.

En la inactivación catabólica por nitrógeno (NCI), después de la adición de iones amonio a un cultivo de células creciendo en prolina, la *GAP1* sufre una rápida y completa inactivación. Esta inhibición de la actividad de la permeasa es reversible y puede ser suprimida por varias mutaciones (Grenson, 1983a): las mutaciones *pgr* están localizadas en el gen *GAP1* y afectan específicamente a esta permeasa (Grenson y Acheroy, 1982), mientras que las mutaciones *npi1* y *npi2* son independientes del locus *GAP1*. En estas mutantes, debido a la ausencia de inactivación, puede observarse la represión de la síntesis de la permeasa disparada por iones amonio: mientras las células están en crecimiento se detiene un incremento posterior en la actividad de la permeasa. Como consecuencia de esta doble regulación, la permeasa *GAP1* es activa en células creciendo con iones amonio sólo cuando ambos mecanismos de control se suprimen por mutaciones apropiadas. Las mutaciones *npi1* y *npi2* son pleiotrópicas, además de inactivar el proceso inactivante de la *GAP1*, también afectan de la misma manera a las permeasas: de prolina *PUT4*, de ureidosuccinato/alantoato *UEP1/DAL5* (Grenson, 1983a), de glutamina *GNP1* (Grenson y Dubois, 1982) y las permeasas de metilamina-iones amonio *MEP1* y *MEP2* (Dubois y Grenson, 1979; Grenson y Dubois, 1982). El análisis funcional y molecular del producto del gen *NPI1*

demonstró que es requerido para la inactivación y degradación de la GAP1 y que es idéntico al producto del gen *RSP5*, una proteína ligasa (enzima E3) (Hein y col., 1995).

Por otra parte, las mutaciones que anulan específicamente la inactivación por amonio de una permeasa (la mutación *prp* está localizada en el gen *PUT4*, mientras que la mutación *gar* está en el gen *UGA4*), probablemente afecten un sitio receptor de NCI de las permeasas y fortalecen la idea que la NCI, se debe a una modificación química de la permeasa (Grenson, 1992).

Para que la permeasa general de aminoácidos sea activa en células desreprimidas, es necesaria la integridad del gen *NPR1* (reactivador de las permeasas de nitrógeno) (Dubois y Grenson, 1979; Grenson, 1983b; Grenson y Dubois, 1982). Mutaciones en el locus *NPR1* tienen un efecto pleiotrópico, las permeasas que requieren la proteína NPR1 son todas sensibles a los iones amonio (Grenson, 1992). Las mutaciones *npi1* y *npi2*, suprimen el efecto de las mutaciones *npr1* y además, el producto del gen *NPR1* no es necesario para la actividad de las permeasas. El conjunto de estos datos llevaron a Grenson y col. a la conclusión que el producto del gen *NPR1* es una proteína reguladora que ejerce un control positivo sobre la actividad de estas permeasas y que es exclusivamente requerido para contrarrestar el efecto inactivante de los productos de los genes *NPI*. La idea anterior, se refuerza por el hecho que la proteína NPR1 tiene dominios de proteína quinasa (Vandenbol y col., 1990) que podría actuar directamente fosforilando las permeasas. Stanbrough y Magasanik (1995) demostraron que la activación de la GAP1 es producida por fosforilación.

La represión catabólica por nitrógeno (NCR) de la síntesis de la GAP1 fue estudiada por Grenson y col., en cepas mutantes *npi1* y *npi2*, que anulan el mecanismo de inactivación de la permeasa. Estos autores demostraron claramente que la síntesis de la GAP1 es reprimida en células creciendo en presencia de iones amonio. En células silvestres creciendo con prolina la transcripción del gen fue alta, pero muy baja con iones amonio o asparagina como fuente de nitrógeno (Jauniaux y Grenson, 1990). El mismo resultado se obtuvo con las permeasas sensibles a amonio PUT4 (Jauniaux y col., 1987) y UEP1/ DAL5 (Rai y col., 1987). De esta manera la represión catabólica por nitrógeno, actuaría alterando la transcripción de los genes de permeasas o reduciendo la estabilidad de los transcriptos. La posible molécula efectora de la NCR podría ser glutamina, ya que en mutantes *gln1^{ts}* con la glutamina sintetasa termosensible

(reducida síntesis endógena de glutamina a la temperatura restrictiva), se produce la desrepresión de varias permeasas y enzimas, aún en presencia de altas concentraciones de amonio (Grenson, 1983a) y la represión es restaurada por adición de glutamina al medio de cultivo. En las mutantes *gln1^{ts}*, se acumulan los genes transcriptos de las permeasas PUT4 (Jauniaux y col., 1987) y GAP1 (Jauniaux y Grenson, 1990) a la temperatura restrictiva aún en presencia de iones amonio.

También, el producto del gen *URE2/IGDHCR* (Coschigano y Magasanik, 1991) ha sido identificado como una proteína reguladora negativa que interviene en la represión de la síntesis de las permeasas GAP1 y PUT4 y de enzimas del catabolismo de compuestos nitrogenados como NAD-glutamato deshidrogenasa, arginasa, alantoinasa y urea amidoliasa (Dubois y col., 1977). En condiciones de represión, la mutación *gdhCR* produce insensibilidad a la represión por iones amonio de las enzimas nombradas y aumenta fuertemente la acumulación de los genes transcriptos de las permeasas GAP1 (Jauniaux y Grenson, 1990) y PUT4 (Jauniaux y col., 1987).

En la Figura I. 3 se resume la regulación de la GAP1 (Grenson, 1992).

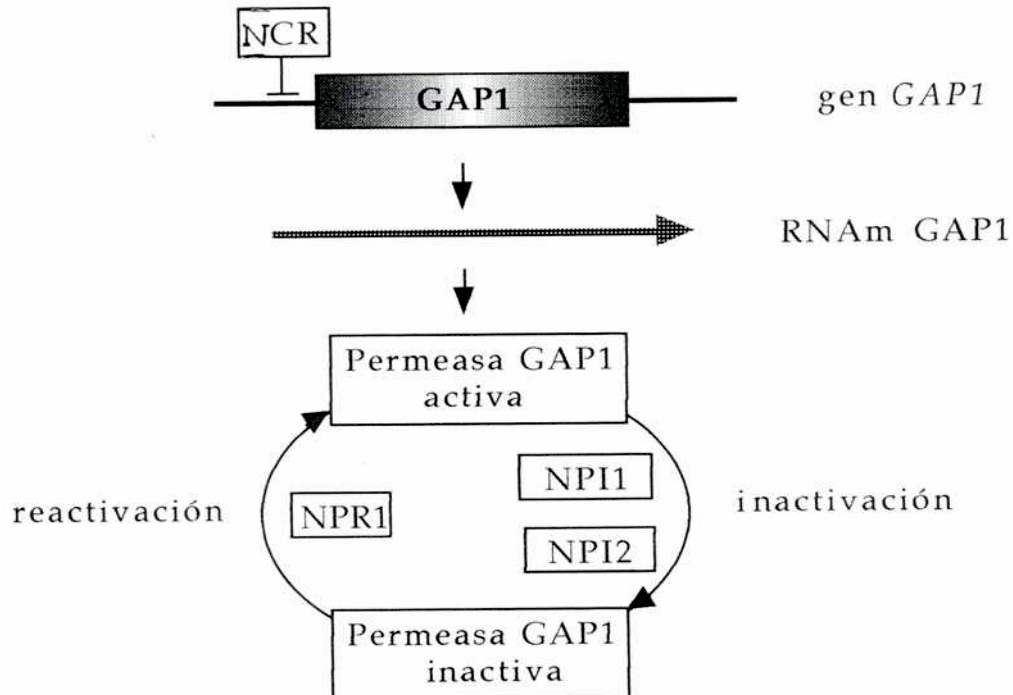


Figura I. 3. Regulación de la síntesis y actividad de la permeasa GAP1 en *S. cerevisiae*. En la parte superior del esquema se representa la represión de la síntesis de la permeasa y en la inferior las características del proceso de inactivación -reactivación.

I. 5. 3. Transinhibición y retroinhibición

Una de las características de los sistemas de transporte de aminoácidos en levadura es su unidireccionalidad. Para evitar la acumulación indefinida de los sustratos, que conducirían a la lisis, las células han desarrollado mecanismos de inhibición de la actividad de las permeasas, conocidos como retroinhibición y transinhibición. Precargando las células de levadura con histidina, se produce una rápida inhibición de la incorporación posterior de histidina, mientras que no se produce efecto precargando con otros aminoácidos (Crabeel y Grenson, 1970; Kotyk y Ríhová, 1972). La GAP1 es retroinhibida por la preacumulación de sus sustratos; esta inhibición es no competitiva, ya que los valores de K_T no varían, mientras que los valores de $J_{m\acute{a}x}$ disminuyen (Grenson, 1992). Para cada permeasa, la especificidad de sustrato y del retroinhibidor es la misma; la única excepción es la permeasa de prolina que es transinhibida por todos los aminoácidos (Horák y Ríhová, 1982). El transporte de la mayoría de los aminoácidos en *S. cerevisiae*, es inhibido cuando se bloquea la síntesis de proteínas con cicloheximida. Este hecho, puede deberse a la retroinhibición de las permeasas por los aminoácidos sintetizados por las células (Grenson y col., 1968) ya que, si las levaduras se ayunan de fuente de nitrógeno para bloquear la síntesis de proteínas, se produce una muy alta actividad de transporte (Grenson y col., 1970).

I. 5. 4. Compartimentalización intracelular de los aminoácidos

En *S. cerevisiae*, los aminoácidos son transportados y almacenados en las vacuolas como una reserva de nitrógeno. Wiemken (1975) y Durr y col. (1979), analizaron cuantitativamente los reservorios citoplasmático y vacuolar, en células de *S. cerevisiae* creciendo en medio mínimo, observando que los aminoácidos básicos se localizan casi exclusivamente en las vacuolas, los aminoácidos ácidos, glicina, treonina y prolina en su mayor parte en el citoplasma y los aminoácidos restantes repartidos un 50% en el citoplasma y un 50% en la vacuola. Estudios cinéticos realizados en vesículas de membrana vacuolar indicaron la presencia de siete sistemas independientes de contratransporte H^+ /aminoácido con estrecha especificidad de sustrato, todos impulsados por una fuerza protón motriz establecida por hidrólisis de ATP (Sato y col., 1984 a y b). Para verificar si la compartimentalización celular es la causa del flujo unidireccional en el transporte de aminoácidos, Opekarova y col. (1993)

estudiaron el transporte de arginina en vesículas de membrana plasmática obtenidas de células que sobreexpresaban el gen *CAN1* (permeasa de arginina) y en una mutante deficiente en la permeasa *can1* de *S. cerevisiae*. Estos experimentos mostraron que la asimetría cinética de la permeasa de arginina es la responsable para retener el sustrato en las vesículas una vez que ha sido incorporado. Ni la adición de arginina al medio externo, ni la anulación de la fuerza protón motriz por desacoplantes lleva a un eflujo significativo de la arginina acumulada. Por lo tanto, el influjo unidireccional no está relacionado a la compartimentalización celular.

I. 6. Mecanismo de acoplamiento de energía en el transporte de aminoácidos

I. 6. 1. Hipótesis quimiosmótica

La hipótesis quimiosmótica desarrollada por Mitchell para explicar la transducción de energía en mitocondrias, cloroplastos y membranas bacterianas (Mitchell, 1963) fue posteriormente utilizada, para la interpretación del transporte activo de nutrientes (hidratos de carbono y aminoácidos) a través de la membrana plasmática en células eucariotas.

El concepto quimiosmótico en su forma más general postula que la fuerza impulsora del transporte activo de un soluto es un gradiente electroquímico de iones: H^+ en el caso de la mayoría de los microorganismos procariontes (Ramos, S. y col., 1976) y eucariotas y Na^+ en todas las células de mamíferos (Christensen, 1985). En el primer caso la incorporación del nutriente está ligada con la captación de H^+ por medio de un transportador específico al que se unen ambos, proceso denominado cotransporte (el ión impulsor y el soluto se mueven en la misma dirección) y el gradiente de protones es generado por un sistema de membrana identificado como H^+ -ATPasa que expulsan H^+ al medio extracelular acoplada con hidrólisis de ATP.

De esta manera, el gradiente electroquímico de protones ($\Delta\mu_{H^+} / F = \Delta p$) viene dado por la ecuación:

$$\Delta p = \Delta\psi - 2.3 RT\Delta pH / F$$

donde Δp es la fuerza protón motriz, $\Delta\psi$ es el potencial de membrana y ΔpH la diferencia ($pH_i - pH_e$) a través de la membrana.

En un gran número de experimentos se observó que cuando *S. cerevisiae* es suspendida en un medio sin fuente de energía externa o cuando es cultivada en condiciones aeróbica o anaeróbica en presencia de un sustrato fermentable, se produce un descenso del pH_e (Riemersma y col., 1974; Sigler y col., 1978). La acidificación del medio externo está relacionada a la glucólisis más que a la respiración (Sigler y col., 1978, 1981).

La caracterización de una H^+ -ATPasa dependiente de Mg^{2+} en membrana plasmática de levadura *Schizosaccharomyces pombe* (Delhez y col., 1977; Dufour y col., 1980) y *S. cerevisiae* (Peters y Borst-Pauwels, 1979; Serrano, 1980; Willsky, 1979) con distintas propiedades de la mitocondrial (Schatz y col., 1967) y de membrana de vacuola (van der Wilden y Matilde, 1978) permitió demostrar que es el componente responsable del transporte electrogénico de protón. La H^+ -ATPasa de membrana plasmática es inhibida por ortovanadato, DCCD y DES que también inhiben la extrusión de protones y por el antibiótico DIO 9, pero es prácticamente insensible a oligomicina, ouabaína y azida (Bowman y col., 1978; Delhez y col., 1977; Dufour y Goffeau, 1980; Dufour y col., 1980; Goffeau y Slyman, 1981; Peters y Borst-Pauwels, 1979; Serrano, 1978, 1980; Willsky, 1979).

El transporte de H^+ dependiente de ATP fue demostrado por reconstitución de ATPasa purificada de membrana plasmática en liposomas de *S. cerevisiae* (Malpartida y Serrano, 1981 a y b), *S. pombe* (Villalobo, 1982; Villalobo y col., 1981) y *S. carlsbergensis* (Lichko y Okorov, 1984).

Cid y Serrano, (1988) utilizando mutantes con una ATPasa termosensible demostraron que no hay transporte de leucina o histidina a la temperatura restrictiva mientras que la actividad de transporte se restablece a la temperatura en que la H^+ -ATPasa acidifica el medio, constituyendo una evidencia de la relación entre el proceso de acidificación del medio externo y el transporte de nutrientes como los aminoácidos.

Aunque existe un acuerdo general en que muchos sistemas de transporte están impulsados por el Δp , hay evidencias de que algunos aminoácidos como L-prolina son escasamente transportados en condiciones de anaerobiosis, sin que los valores del ΔpH y del $\Delta \Psi$ estén reducidos significativamente (Horák y Kotyk, 1986). Horák y Kotyk han sugerido que la actividad de los sistemas de transporte no dependen estrictamente de la diferencia total del gradiente electroquímico, sino que han enfatizado la

importancia de gradientes locales de pH, cuyos valores podrían diferir de los medidos considerando una distribución uniforme de protones dentro de la célula.

I. 6. 2. Cotransporte de aminoácidos, la función del potasio

Eddy y col. (1970a) observaron que en *S. carlsbergensis* semiayunada la velocidad inicial de transporte de glicina era estimulada al disminuir el pH de la suspensión de levadura y se producía el eflujo de dos equivalentes de K^+ y el transporte del aminoácido era inhibido no competitivamente elevando la concentración externa de K^+ . Datos similares se obtuvieron con el metabolismo energético bloqueado (Eddy y col., 1970b) donde las células retienen la capacidad de acumular glicina a bajas concentraciones contra su gradiente a un pH_e relativamente bajo y a baja concentración extracelular de K^+ , produciéndose un influjo de dos H^+ y la expulsión de dos K^+ (Eddy y col., 1971; Seaston y col., 1976). Una compensación estequiométrica de carga por K^+ también fue detectada para el transporte de glicina en *S. cerevisiae* (Ballarin-Denti y col., 1984) y para glicina, L-lisina, L-arginina y L-glutamato en *C. utilis* (Eddy y col., 1977) cuando la bomba de protones no está en funcionamiento.

Estos datos llevaron a la conclusión que la acumulación de aminoácidos bajo ciertas condiciones es un proceso impulsado por el flujo combinado de H^+ y K^+ hacia sus gradientes iónicos a través de la membrana plasmática. Varios investigadores demostraron que el movimiento compensatorio de los iones K^+ tiene solamente una función facultativa. La incorporación de glicina en presencia de glucosa no acelera el recambio de K^+ (Eddy y col., 1970a), la incorporación de glicina en presencia de K^+ fue menor cuando la levadura fermenta glucosa comparada con condiciones de ayuno y la incorporación de glicina fue inhibida parcialmente por DNP en células energizadas con glucosa. El DNP impide el transporte activo de glicina en suspensiones de levadura bloqueadas en su metabolismo energético porque anula el gradiente de protones (Mitchell, 1963; Seaston y col., 1976). Las investigaciones de Ramos y col. (1977, 1980) sobre el efecto de conductores de protones en el transporte de leucina, en cepas ρ^- deficientes respiratorias de varias especies de *Saccharomyces* constituyeron una importante confirmación de que el aminoácido es concentrado por las células a expensas de un gradiente de H^+ y que la salida de K^+ sirve simplemente para neutralizar el influjo de H^+ cuando la bomba de protones no está en funcionamiento.

I. 7. Objetivos

El transporte de L-leucina en *S. cerevisiae* es mediado por la permeasa general de aminoácidos, GAP1, inactiva en medios conteniendo una fuente rica de nitrógeno como los iones amonio o una fuente compleja, y al menos por otros dos sistemas más específicos, cinéticamente caracterizados y definidos como S1 y S2 (Ramos y col., 1980; Kotliar y col., 1994). La multiplicidad de permeasas, transportando L-leucina, constituye una dificultad en el estudio del transporte del aminoácido por cada una de ellas. En el caso de sistemas múltiples, para soslayar este inconveniente, se inactiva selectivamente cada una de las permeasas transportando un dado aminoácido, seleccionando mutantes resistentes a la inhibición del crecimiento, en presencia de análogos tóxicos, que se incorporan a las células por las mismas permeasas que los sustratos naturales. Utilizando esta metodología se obtuvo la cepa **MMY2/H3 gap1**, que permitió determinar las propiedades cinéticas de S1 y S2, sin interferencia de la GAP1 (Kotliar y col., 1994).

Por otra parte, experimentos de inhibición de la entrada de L-leucina por otros aminoácidos estructuralmente relacionado, en la cepa **MMY2/H3 gap1**, mostraron la misma especificidad de los sistemas S1 y S2. Debido a la superposición de las actividades de S1 y S2, no se pudieron estudiar individualmente otras propiedades. Por consiguiente, el aislamiento y caracterización de mutantes defectivas en el transporte de L-leucina por los sistemas S1 y/o S2, es un paso clave y previo al clonado de genes estructurales y/o regulatorios asociados con el transporte del aminoácido.

Estudios sobre el transporte de L-leucina en *Schizosaccharomyces pombe*, mostraron que L-iso-leucina, L-valina, L-fenilalanina y L-cisteína son inhibidores competitivos del transporte de L-leucina por el sistema de alta afinidad S1 (Sychrová y col., 1989). Debido a que en *S. cerevisiae*, la especificidad de los sistemas de transporte de L-leucina no fue estudiada en más detalle, algunos investigadores asumieron tácitamente que L-iso-leucina y L-valina son también sustratos de los sistemas S1 y S2. Sin embargo, no se presentaron evidencias experimentales de que los aminoácidos de cadena ramificada sean transportados por S1 y S2. Además, el transporte de L-iso-leucina y L-valina en *S. cerevisiae* ha sido poco estudiado. Ferreras y col. (1989), demostraron que en *S. cerevisiae* var. *ellipsoideus*, el transporte de L-valina exhibe dos componentes, relacionando los mismos con la GAP1. Tullin y col. (1991),

identificaron un sistema de alta afinidad denominado BAP1 (**br**anched-chain amino acid permease), que transportaría los aminoácidos de cadena ramificada, en condiciones de represión de la GAP1.

Considerando estos antecedentes y de acuerdo a la información fragmentada disponible, el objetivo de esta tesis fue el de estudiar exhaustivamente el proceso de transporte de los L-aminoácidos neutros y, en particular, de los aminoácidos de cadena ramificada: leucina, isoleucina y valina en cepas silvestres, en mutantes *gap1* y en dobles o triples mutantes: *gap1TFL^R*, defectivas en el transporte de L-leucina por los sistemas S1, S2 o de ambos. La mutante *gap1TFL^R* fue aislada a partir de la cepa *gap1* por la resistencia a triflúorleucina, análogo tóxico de leucina. Los resultados de este estudio permitirán establecer si las mutaciones presentes en simples, dobles o triples mutantes, defectivas en el transporte de L-leucina serán también defectivas en el transporte de L-isoleucina y L-valina, así como establecer las relaciones entre los sistemas GAP1, S1 y S2 de transporte de L-leucina y el/los sistema/s de transporte de L-isoleucina y L-valina.

Con el fin de cumplir con los objetivos expuestos, se decide realizar el siguiente plan de investigación:

- 1- Caracterización cinética de los sistemas de transporte participantes.
- 2- Especificidad de los mismos.
- 3- Relación actividad de transporte/pH externo.
- 4- Regulación de la actividad de los sistemas transportadores por la fuente de nitrógeno del medio de cultivo.
- 5- Genes relacionados con la actividad de transporte por los sistemas S1 y S2.

MATERIALES Y METODOS

MATERIALES Y METODOS

	Página
II. 1. Cepas	29
II. 2. Medios de cultivo y mantenimiento de las células	31
II. 3. Cultivo y condiciones de crecimiento	32
II. 3. 1. Medio líquido	32
II. 3. 2. Medio sólido	33
II. 3. 3. Curvas de crecimiento	33
II. 4. Suspensión celular de trabajo	34
II. 5. Ensayo de incorporación de L- ¹⁴ C-aminoácidos de cadena ramificada	34
II. 6. Recuperación y análisis del ¹⁴ C acumulado en las células	34
II. 7. Determinación del contenido intracelular de aminoácidos libres	35
II. 8. Determinación de parámetros cinéticos	35
II. 9. Ensayos de inhibición del transporte de L- ¹⁴ C-aminoácidos	36
II. 10. Efecto del pH extracelular sobre el transporte de L- ¹⁴ C-leucina	36
II. 11. Determinación del pH intracelular	36
II. 12. Medida de la salida de protones	37
II. 13. Determinación de la radiactividad de las muestras	37
II. 14. Preparación de protoplastos	37
II. 14. 1. Coloración de PAS	38
II. 14. 2. Entrada de L- ¹⁴ C-leucina	39
II. 15. Tratamiento osmótico	39
II. 16. Diseño experimental	40
II. 17. Origen y calidad de los reactivos	40

II. MATERIALES Y METODOS

II. 1. Cepas

En este trabajo se utilizaron las siguientes cepas de *Saccharomyces cerevisiae* provistas por el Profesor Dr. James R. Mattoon, Director del Biotechnology Center de la Universidad de Colorado, Colorado Springs, USA.

Cepa	Genotipo
MMY2	<i>Mat a ura3</i>
MMY2/H3	<i>Mat a ura3 gap1</i>
MMY2/H3/LT1	<i>Mat a ura3 gap1let1 let2</i>
MMY2/LT1/GAP1	<i>Mat a ura3 let1 let2</i>
KE3-R23	<i>Mat α lys2 gap1</i>
KE-5 (diploide)	<i>Mat α/a gap1/gap1 LET1/let1 LET2/let2 lys2/LYS2 URA3/ura3</i>

Las cepas haploides MMY2/H3, MMY2/H3/LT1 y MMY2/LT1/GAP1 son isogénicas de MMY2, excepto para las mutaciones mencionadas y fueron aisladas por el Dr. Natalio Kotliar, becario externo del CONICET, en el laboratorio del Prof. Dr. J. R. Mattoon. La cepa MMY2/H3 deficiente en el gen estructural de la permeasa general de aminoácidos (GAP1), fue obtenida a partir de la cepa normal MMY2 por su resistencia a la inhibición del crecimiento en presencia de D-histidina 10 mM en medio mínimo prolina, como fue descrito por Rytka (1975) (Kotliar y col., 1994). A partir de la cepa MMY2/H3 se obtuvieron 38 mutantes resistentes a la inhibición del crecimiento en presencia de trifluorleucina (TFL), análogo tóxico de leucina, en medio mínimo amonio. De estas mutantes sólo una, denominada MMY2/H3/LT1 resistente a TFL 50 µM, mostró un lento crecimiento sobre leucina como única fuente de nitrógeno y una incorporación disminuída del aminoácido. La cepa MMY2/LT1/GAP1 deriva de la cepa MMY2/H3/LT1 y fue aislada por reversión de la mutación *gap1* por su crecimiento en medio mínimo con citrulina 1 mM como única fuente de nitrógeno y la recuperación de la sensibilidad a D-histidina 10 mM en medio mínimo prolina. La cepa KE3-R23 tiene un

93,75 % del contenido genético de MMY2/H3 y fue obtenida a partir de la misma por cuatro cruces sucesivos.

El análisis genético de la mutante MMY2/H3/LT1 fue realizado y facilitado por el Prof. Dr. J. R. Mattoon. La cepa MMY2/H3/LT1 se cruzó con la cepa KE3-R23 (sensible a la presencia de TFL en el medio de cultivo), la diploide KE-5 que es homocigota para la mutación *gap1* se esporuló y se analizaron 14 tetradas por su crecimiento en medio MA en presencia de varias concentraciones de TFL (rango 0-100 μ M). Los resultados de la Tabla II. 1 muestran que la segregación del carácter de resistencia a TFL no corresponde a un único gen mutado ($2^S : 2^R$).

Tabla II. 1. Segregación de la resistencia a TFL.

Tetrada	Segregación en medio mínimo amonio conteniendo TFL				Genotipo
	25 μ M	50 μ M	75 μ M	100 μ M	
(P) KE5-3	A B C D	r r/S R R	S S R R	S S R R	<i>LET1LET2</i> <i>LET1LET2</i> <i>let1let2</i> <i>let1let2</i>
(T) KE5-17	A B C D	R r/R r R	R S/r S R	r/R S/r S R	<i>let1LET2</i> <i>LET1let2</i> <i>LET1LET2</i> <i>let1let2</i>
(NP) KE5-1	A B C D	R R R R	R r/S S/r R	R/r r/S S R/r	<i>let1LET2</i> <i>LET1let2</i> <i>LET1let2</i> <i>let1LET2</i>
KE3R23 MMY2/H3/LT1 KE5		S/r R r/R	S R S	S R S	<i>LET1LET2</i> <i>let1let2</i>

Tetradas tipo parental (P): KE5- 3 y 31, tipo no parental (NP): KE5- 1, 6 y 25, tetratipo (T): KE5- 9, 11, 17, 18, 20, 23, 26, 29 y 30. Las células crecieron en placas con medio MA sólido con concentraciones de TFL entre 0 -100 μ M durante 48 horas. En medio MA todas las cepas crecen, en medio MA + TFL se evaluaron según la siguiente escala S: sensibilidad (no se produce crecimiento), r: débil resistencia (crecimiento escaso) y R: resistencia (igual crecimiento que en ausencia de TFL).

La relación entre los diferentes tipos de tetradas, T: P: NP, 9 :2 :3, indicó que al menos dos genes que segregan independientemente, denominados *LET* (leucine

transport), están mutados en la cepa MMY2/H3/LT1. La mutación denominada *let1* produce la resistencia a TFL hasta 75 μM , pero a concentraciones mayores de TFL se recobra la sensibilidad, mientras que la otra mutación *let2* produce débil resistencia a TFL (hasta 50 μM) y sensibilidad a mayores concentraciones. Cepas altamente resistentes contienen ambos genes mutados (*let1 let2*) mientras que cepas sensibles contienen los correspondientes alelos normales (*LET1LET2*).

II. 2. Medios de cultivo y mantenimiento de las células

Los medios de cultivos empleados para el crecimiento celular fueron los siguientes:

Medios complejos	composición por litro
YPD	extracto de levadura 10 g, peptona 20 g y glucosa 20 g.
Wickerham (1951)	extracto de malta 3 g, extracto de levadura 3 g, peptona 10 g y glucosa 10 g.

Medios mínimos	composición por litro
MA (mínimo amonio)	biotina 0,4 mg, pantotenato de calcio 10 mg, i-inositol 200 mg, tiamina. HCl 88 mg, piridoxina. HCl 24 mg, nicotinamida 5 mg, ZnSO ₄ . 7H ₂ O 17,4 mg, CuSO ₄ . 5H ₂ O 1mg, FeSO ₄ . 7H ₂ O 7,3 mg, MgSO ₄ . 7H ₂ O 1 g, KH ₂ PO ₄ 4 g, NaH ₂ PO ₄ 12 g, ácido succínico 11,8 g, glucosa 20 g y (NH ₄) ₂ SO ₄ 3 g.
MP (mínimo prolina)	L-prolina 1g como fuente de nitrógeno en lugar de (NH ₄) ₂ SO ₄ .

Los medios mínimos utilizados fueron los descritos originariamente por Vavra y Johnson (1956) con algunas modificaciones. Para suplir los requerimientos auxotróficos de las cepas, los medios mínimos fueron suplementados con uracilo 10 mg l⁻¹ y/o L-lisina 40 mg l⁻¹. El pH final fue de 4,5 ajustado con HOK 3 M.

Todos los medios sólidos contenían 30 g l⁻¹ de agar y en los medios mínimos sólidos el pH final fue 5,0. En algunos experimentos, se utilizó una variedad de aminoácidos agregados, individualmente, como única fuente de nitrógeno, a la concentración indicada en cada caso

Para el mantenimiento de las células se realizaron repiques periódicos en tubos conteniendo YPD agar inclinado. Las células se dejaron crecer durante 48 horas a 30 °C y al cabo de ese tiempo se guardaron a 4 °C hasta el momento de su uso.

Los medios de cultivo y todo el material empleado en la siembra de las células se esterilizaron por autoclavado a 1,1-1,3 atmósferas de presión durante 15 minutos. Los repiques y siembras se realizaron en condiciones estériles utilizándose luz UV y/o un flujo laminar.

II. 3. Cultivo y condiciones de crecimiento

II. 3. 1. Medio líquido

En todos los experimentos se preparó inicialmente un precultivo de las células en 5 ml del medio requerido a partir de los tubos YPD-agar, que luego se utilizó para inocular el mismo medio líquido empleado en la experiencia. Con este fin se utilizaron erlenmeyers con el respectivo medio líquido ocupando el 20 % del volumen total. El volumen de precultivo sembrado fue 1-3 % del volumen final del medio de cultivo. Todos los precultivos y cultivos crecieron hasta alcanzar el final de la fase exponencial, en condiciones aeróbicas, con agitación constante, en un agitador New Brunswick modelo G-10 (New Brunswick Scientific Co. Inc., N. Y. USA) operando a 200-250 rpm, a una temperatura constante de 30 °C.

Las células se cosecharon por centrifugación a 3000 x g durante 5 minutos a 4 °C, en centrífuga Sorvall modelo RC-5 y lavadas dos veces con agua destilada. Las células así obtenidas, denominadas "células del medio", se utilizaron inmediatamente para los ensayos de transporte. En otros casos, las células se resuspendieron nuevamente en 50 ml de agua destilada y se mantuvieron en condiciones de aireación constante durante 18 horas, con el fin de agotar las reservas endógenas de energía. La suspensión fue centrifugada y el sedimento obtenido constituye las denominadas "células ayunadas". Si las células ayunadas son preincubadas con glucosa 5 mM durante 15 minutos a 30 °C, se denominan "células energizadas".

II. 3. 2. Medio sólido

En los experimentos donde se comparó el crecimiento celular en placa, utilizando diferentes aminoácidos como única fuente de nitrógeno, las células fueron primero cultivadas en medio mínimo líquido con prolina como única fuente de nitrógeno durante 28 horas. Cada cultivo fue diluído convenientemente para obtener una A_{570} 0,2 y una alícuota de 10 μ l se sembró en cada medio mínimo sólido conteniendo sólo un aminoácido como fuente de nitrógeno

II. 3. 3. Curvas de crecimiento

El conocimiento de la curva de crecimiento es requerido para los estudios experimentales, ya que las condiciones fisiológicas celulares en un medio nutritivo adecuado, varían en los diferentes estadios del crecimiento.

El cultivo de levaduras exhibe una curva de crecimiento caracterizada por tres fases: fase inicial o de inducción (fase lag); fase exponencial de crecimiento en la cual la velocidad de división del microorganismo es constante (fase log) y fase terminal estacionaria.

El crecimiento celular se siguió midiendo la turbidez de la suspensión de levadura en un espectrofotómetro (Beckman, modelo DU-65) a 570 nm en función del tiempo. El tiempo transcurrido entre la división de una célula y la división siguiente, se conoce con el nombre de "tiempo de generación"; en el caso de un cultivo de levaduras, el tiempo total de generación para todos los individuos del cultivo es casi constante y se denomina "tiempo de generación medio" (G). Los tiempos de generación se calcularon a partir de las curvas de crecimiento, usando las lecturas de densidad óptica como medida del número de células. Dicha constante puede determinarse a partir de la pendiente en un gráfico de $\ln (A_{570 \text{ nm}})$ en función del tiempo. Se aplicó la siguiente expresión:

$$G = \frac{0,693 (t - t_0)}{\ln (A/A_0)}$$

G: tiempo de generación

t: tiempo

A: absorbancia a 570 nm a tiempo t

A_0 : absorbancia a 570 nm a tiempo cero

II. 4. Suspensión celular de trabajo

El sedimento de células se resuspendió en agua destilada y la concentración celular se estimó midiendo la absorbancia a 570 nm de una alícuota de la suspensión de levaduras diluída 1:100. El dato obtenido se interpoló en una curva standard, trazada con concentraciones conocidas de suspensión celular. El valor de dicha concentración se consideró aproximado y se verificó en cada experimento, mediante el método de pesada de una alícuota de la suspensión de levaduras, que se secó en estufa a 104 °C, durante 24 horas, hasta constancia de peso.

II. 5. Ensayo de incorporación de L-¹⁴C-aminoácidos de cadena ramificada

Un ml de mezcla de reacción, conteniendo 5 mg de peso seco de células en amortiguador ftalato ácido de potasio (FHK) 20 mM, pH 4,5 y el L-¹⁴C-aminoácido (leucina, isoleucina o valina) 0,05 ó 1,0 mM, se incubó a 30 °C con agitación constante. A los tiempos indicados en cada caso, se tomaron alícuotas de 200 µl de la mezcla de reacción que se filtraron inmediatamente a través de filtros Schleicher & Schüll 3362 de 0,45 µm de diámetro de poro. Los filtros conteniendo las células se lavaron tres veces con 2,0 ml de FHK 20 mM a 4 °C. El tiempo requerido para tomar la muestra, filtrarla y lavarla no superó los 7 segundos.

II. 6. Recuperación y análisis del ¹⁴C acumulado en las células

Luego de incubar las células con L-¹⁴C-isoleucina o L-¹⁴C-valina como se indicó en el punto anterior, se tomaron muestras de 0,5 ml a 10 y 15 minutos, que inmediatamente se diluyeron con 0,5 ml de solución amortiguadora FHK 20 mM a 4 °C. Las suspensiones se centrifugaron inmediatamente en centrífuga Eppendorf modelo 5414 (Eppendorf G, Hamburgo, Alemania). El sedimento de células se lavó dos veces con la misma solución amortiguadora y los sobrenadantes se reunieron para determinar posteriormente su radiactividad. Las células se incubaron con 0,5 ml de una mezcla metanol / agua, 9:1 (v/v) durante dos horas para la extracción de aminoácidos. Al cabo de ese tiempo, la suspensión fue centrifugada y, tanto en el residuo de levaduras como en el sobrenadante metanólico, se midió la radiactividad. De esta manera se pudo diferenciar la fracción ¹⁴C-no soluble (aminoácido incorporado a proteínas) de la

fracción soluble en metanol / agua (aminoácidos solubles). Para verificar que la marca soluble pertenecía a los aminoácidos ensayados, se realizó una cromatografía de los sobrenadantes (previamente concentrados y resuspendidos en agua) sobre papel Whatman N° 1. El solvente de corrida utilizado fue la mezcla n-butanol : ácido acético : agua (25:4:10). La cromatografía se corrió aproximadamente durante 5 horas, luego el papel se dejó secar y se reveló con solución de ninhidrina 2% en acetona para observación visual, dando la típica coloración azul violácea para la reacción con los α - aminoácidos. El papel se cortó en fracciones de 1,0 cm, a los que se les midió la radiactividad. La radiactividad de la fracción ^{14}C -no soluble, se determinó resuspendiendo el residuo de levaduras en 0,2 ml de agua destilada y colocando la misma en 5 ml de líquido de centelleo Bray (1960).

II. 7. Determinación del contenido intracelular de aminoácidos libres

Las células de levadura fueron cultivadas y cosechadas según la técnica descripta. Las células se lavaron dos veces con agua destilada libre de amonio a 4 °C y se resuspendieron en 10 ml de la misma a 4 °C, de modo de obtener una suspensión de aproximadamente 6 mg ml⁻¹. De dicha suspensión, una porción se utilizó para la determinación del peso seco y del resto se tomaron muestras de 1 ml que fueron centrifugadas, los sobrenadantes se descartaron y los precipitados se extrajeron dos veces con metanol /agua (9:1). Al cabo de dos horas, las muestras fueron centrifugadas y los extractos metanólicos se evaporaron en desecador al vacío. Los residuos se disolvieron en solución amortiguadora de citrato de sodio 50 mM, pH 2,2 y analizados sus contenidos de aminoácidos, empleando un analizador de aminoácidos Beckman 119CL.

II. 8. Determinación de parámetros cinéticos

Para determinar las velocidades iniciales de transporte de cada aminoácido se tomaron muestras entre 0 y 4 minutos, de la manera descripta anteriormente, rango en el cual la incorporación es lineal. Las velocidades se calcularon a partir de la pendiente de la regresión lineal para cada concentración externa del aminoácido ensayado. Cuando se trabajó con el sistema GAP1 desreprimido, el cálculo de las velocidades

iniciales se realizó hasta 1-2 minutos, dependiendo del aminoácido ensayado, debido a la rápida saturación que presenta dicho sistema en estas condiciones experimentales.

II. 9. Ensayos de inhibición del transporte de los L-¹⁴C-aminoácidos

Para determinar el efecto de diferentes aminoácidos sobre el transporte de los L-¹⁴C-aminoácidos de cadena ramificada, a la suspensión celular de trabajo se le adicionó simultáneamente (tiempo cero) el aminoácido competidor y el aminoácido radiactivo ensayado, al cabo de 3 minutos de incubación las muestras fueron procesadas como se describió en II. 6. La concentración del aminoácido competidor fue diez veces mayor que la del aminoácido radiactivo.

II. 10. Efecto del pH extracelular sobre el transporte de L-¹⁴C-leucina

La entrada de L-¹⁴C-leucina se midió utilizando una mezcla de reacción, en la cual las células fueron resuspendidas en solución amortiguadora de FHK 20 mM de diferentes pH (3,0-6,0). Al cabo de 3 minutos de incubación las muestras fueron procesadas como se describió previamente.

II. 11. Determinación del pH intracelular

El método utilizado se basa en la medición de la distribución intra-extracelular de un ácido débil como el ácido benzoico (Bongioanni y Ramos, 1988). Las medidas se realizaron en condiciones análogas a las descritas para el estudio de la incorporación de L-¹⁴C-leucina (amortiguador, filtración, lavado, etc), reemplazando el aminoácido por el ácido ¹⁴C-carboxi-benzoico 50 μM. La concentración intracelular del ácido (Ci) se determinó a partir de la radiactividad retenida en la membrana filtrante y el volumen de agua intracelular, 2 μl mg⁻¹ de peso seco de células (Cooper, 1982). La concentración externa del ácido (Ce) se calculó por diferencia entre los μmoles iniciales de ácido ¹⁴C-carboxi-benzoico presentes en la muestra y los μmoles retenidos en el filtro, el volumen extracelular se consideró igual al volumen de muestra tomado (0,2 ml).

La concentración intracelular de protones (H⁺); se calculó mediante la siguiente ecuación:

$$(H^+)_i = [C_i/C_e (1/ (H^+)_e + 1/ K_d) - 1/ K_d]^{-1}$$

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

El gradiente de la concentración de protones, ΔpH se calculó de acuerdo a : $\Delta pH = pH_i - pH_e$, donde pH_e corresponde al valor de pH de la solución amortiguadora.

II. 12. Medida de la salida de protones

Las células (6 mg ml^{-1}) se resuspendieron en 5 ml de FHK 4 mM y glucosa 5 mM, la modificación del pH_e a 30 °C se siguió en un pHmetro Corning modelo 130. La concentración de protones liberados al medio se estimaron a partir de una calibración previa con pulsos de HCl.

II. 13. Determinación de la radiactividad de las muestras

La actividad total de ^{14}C de las muestras retenidas en las membranas filtrantes, fue determinada en un contador de centelleo líquido Tracor Analytic Delta 300 (Tracor Analytic, Illinois, USA). Los filtros, una vez secos, se transfirieron a viales de vidrio conteniendo 5 ml de la mezcla centelleadora compuesta por 2,5-difenil oxazol (PPO) 2,5 g y 1,4-bis 5-fenil-2-oxazoil benceno (POPOP) 50 mg por litro de tolueno.

En el caso de determinar la radiactividad de muestras acuosas se empleó el líquido de Bray como mezcla centelleadora (Bray, 1960), conteniendo PPO 4g; POPOP 0,2 g; naftaleno 60 g; etilenglicol 60 ml; metanol 100 ml y dioxano hasta completar 1 litro.

II. 14. Preparación de protoplastos

Las células de levadura fueron cultivadas, cosechadas y lavadas según la técnica descrita. Las células se resuspendieron en concentración aproximada de $30\text{-}50 \text{ mg ml}^{-1}$, en solución amortiguadora Tris-HCl 100 mM pH 9,3 conteniendo 1% de 2-mercaptoetanol y se incubaron durante 30 minutos con agitación a 30 °C. Posteriormente la suspensión se centrifugó a 4 °C, el sedimento se lavó con sorbitol 1M . Las células pretratadas se resuspendieron a la misma concentración anterior en el

estabilizador osmótico sorbitol 1 M conteniendo 3-4% (p/v) de la enzima Helicasa (Laboratorios IBF, Industrie Biologique Francaise) y se incubaron a 30 °C. La transformación de células en protoplastos se siguió en función del tiempo por medida de densidad óptica de la suspensión, diluyendo alícuotas de la mezcla de reacción 1:10 en agua (pH 9,3) o en sorbitol 1 M, verificándose la lisis de los protoplastos en agua. Cuando el 90 % de las células fueron convertidas en protoplastos (60 min), determinado por observación microscópica y recuento de alícuotas diluídas (cámara de Neubauer), se centrifugaron a 2500 g durante 5 minutos y el precipitado se lavó dos veces con sorbitol 1 M a 4 °C. Los protoplastos así obtenidos se conservaron en frío hasta su posterior utilización. El contenido de proteínas de los protoplastos se determinó por el método de Lowry (1951) utilizando albúmina bovina como standard.

II. 14. 1. Coloración de PAS

La coloración de PAS (ácido peryódico de Schiff) permitió diferenciar células enteras cuya pared celular se tiñe de color rojo, de protoplastos que carecen de la misma y por lo tanto no se tiñen. Esta metodología se utilizó debido a que en el transcurso de la preparación de protoplastos, las alícuotas diluídas en agua de la mezcla de reacción mantenían la turbidez, por lo tanto o no se había llevado a cabo la transformación de células en protoplastos o eran protoplastos en agua.

Los extendidos de levaduras enteras y protoplastos se fijaron con carnoy (ácido acético: etanol: cloroformo, 1:6:3) y luego se sumergieron en ácido peryódico 0,5 % durante 5 minutos. Posteriormente se lavaron con agua y se sumergieron en reactivo de Schiff (fucsina básica reducida con anhídrido sulfuroso) durante 5 minutos, se lavaron nuevamente y una vez secos se observaron al microscopio.

Se comprobó que en el extendido de la mezcla de reacción en agua había protoplastos, ya que no se observó tinción y además los bordes eran poco definidos y difusos. Por el contrario, en el extendido sin tratamiento enzimático las células se tiñeron de rojo.

A este respecto, Kovác y col., (1987) observaron que si el pH de la suspensión en agua es menor que 4-5, los protoplastos no se lisan pero se hacen no viables y se deforman y si el pH es neutro o alcalino los protoplastos se lisan. Por lo tanto, durante

el seguimiento de la formación de protoplastos el agua para resuspender las alícuotas fue alcalinizada.

II. 14. 2. Entrada de L-¹⁴C-leucina

Se suspendieron protoplastos (aproximadamente 1 mg de proteínas) en amortiguador FHK 20 mM, pH 4,5, conteniendo sorbitol 0,8 M en tubos cónicos Eppendorf de 1,5 ml de capacidad, a 30 °C en baño termostático con agitación constante. Los ensayos de incorporación se iniciaron por el agregado de L-¹⁴C-leucina a la suspensión, siendo el volumen final de la mezcla de reacción de 0,2 ml. Al cabo de 4 minutos, la reacción se detuvo por dilución con sorbitol 1 M enfriado en baño de hielo e inmediata centrifugación en centrífuga Eppendorf durante 1 minuto. Los sobrenadantes se descartaron y los sedimentos se lavaron dos veces con sorbitol 1 M frío. Para determinar la radiactividad, los sedimentos lavados conteniendo los protoplastos, se tomaron dos veces con 0,25 ml de solución metanol/agua 9:1 y se transfirieron cuantitativamente a viales de vidrio conteniendo 5 ml de líquido de Bray como mezcla centelladora.

II. 15. Tratamiento osmótico

Las células fueron sometidas al tratamiento de "shock osmótico", descrito por Schwencke y col., (1971). Las células de levadura (1 g peso húmedo) cultivadas, cosechadas y lavadas como se describió, se resuspendieron en 30 ml de una solución hipertónica (Tris-HCl 100 mM pH 7,5 conteniendo manitol 0,8 M, EDTA 0,5 mM y 2-mercaptoetanol 1 mM). La mezcla se incubó 10 minutos a 30 °C con agitación vigorosa y luego se centrifugó a 6000 g durante 7 minutos, se descartó el sobrenadante y las células se resuspendieron rápidamente en 30 ml de solución hipotónica fría de MgCl₂ 0,5 mM. La mezcla se incubó 10 minutos en baño de hielo con suave agitación y al cabo de ese tiempo, se centrifugó nuevamente. El sedimento resultante corresponde a "células tratadas o shockeadas" y el sobrenadante se denomina "fluido del tratamiento osmótico".

II. 16. Diseño experimental

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

Las muestras a $T_0 + t$ se consideran la expresión de otros procesos. En general si t es mayor de 4 minutos, los valores son los de incorporación total del aminoácido y son el resultado de la entrada, acumulación y salida del mismo de las células. Cuando t es menor o igual a 4 minutos, $T_0 + t$ corresponde a la entrada, transporte o influjo, ya que en ese intervalo no hay eflujo. Para cada una de las determinaciones se verificó la linealidad de la incorporación durante 4 minutos. Para el análisis cinético del transporte de los aminoácidos estudiados, la ecuación de Michaelis-Menten describe adecuadamente el proceso de transporte. Sin embargo, como el transporte es medido en células enteras los valores de K_m y $V_{m\acute{a}x}$ no tienen el mismo significado como en el caso de una reacción enzimática. De esta manera, los valores aparentes de K_m y $V_{m\acute{a}x}$ calculados a partir de los gráficos de dobles recíprocas se refieren como K_T y $J_{m\acute{a}x}$.

En todas las determinaciones se tomaron muestras por duplicado y cada experimento fue realizado al menos tres veces, los valores presentados son su promedio. La desviación de estos valores con respecto a la media fue menos del 10%.

II. 17. Origen y calidad de los reactivos empleados

Los aminoácidos radiactivos uniformemente marcados, L- ^{14}C -leucina, L- ^{14}C -isoleucina, L- ^{14}C -valina y L- ^{14}C -citrulina y el ácido ^{14}C (carboxi)-benzoico fueron de New England Nuclear, USA.

El extracto de levadura, el extracto de malta, la peptona y el agar fueron obtenidos de Difco Laboratories, Detroit, MI, USA.

Los L- y D-aminoácidos, análogos tóxicos de aminoácidos, α -D(+) glucosa, FHK, PPO y vitaminas de Sigma Chem, Co., St. Louis, USA. El POPOP de Nuclear Chicago, Mass. USA. La 5,5,5-triflúor-DL-leucina fue de Fairfield Chem, Blythewood, SC, USA.

Todos los demás reactivos fueron obtenidos de Merck, Darmstadt, Alemania o de Sigma Chem, Co., USA.

RESULTADOS

**Sistemas transportadores de L-leucina en *S. cerevisiae* cepas
gap1 y *MMY2/H3/LT1 gap1let1let2***

	Página
III. 1. Curvas de crecimiento	42
III. 2. Entrada e incorporación de L- ¹⁴ C-leucina	43
III. 2. 1. Medios complejos	43
III. 2. 2. Medios mínimos	46
III. 3. Efecto de activadores e inhibidores metabólicos	48
III. 4. Parámetros cinéticos	49
III. 5. Especificidad	52
III. 6. Efecto del pH externo	54
III. 7. Determinación del pH intracelular	54
III. 8. Actividad de la H ⁺ -ATPasa	56
III. 9. Determinación del contenido intracelular de leucina	57
III. 10. Crecimiento celular en placa y transporte de aminoácidos	58
III. 10. 1. Aminoácidos como fuente de nitrógeno	58
III. 10. 2. En presencia de análogos tóxicos	60
III. 11. Conclusiones	63

III. Sistemas transportadores de L-leucina en *S. cerevisiae* cepas *gap1* y **MMY2/H3/LT1 *gap1*TFL^R**

La incorporación de L-leucina en *S. cerevisiae* es mediada por la permeasa general de aminoácidos GAP1, y al menos por otros dos sistemas más específicos, cinéticamente caracterizados y definidos como S1 y S2 (Ramos y col, 1980; Kotliar y col, 1994). Estudios sobre el transporte de L-leucina en la cepa MMY2/H3 *gap1* (Kotliar y col, 1994) permitieron la determinación de las propiedades cinéticas de S1 y S2 sin la interferencia de la actividad de la GAP1. Sin embargo, no se pudieron caracterizar individualmente otras propiedades de S1 y S2 debido a la interferencia de la superposición de sus actividades.

Por consiguiente, el aislamiento y caracterización de mutantes de levadura deficientes en el transporte, es un paso clave, previo al clonado de genes estructurales y/o regulatorios, asociados a diferentes permeasas. El estudio de estas mutantes proveerá nueva información sobre los procesos mediados por múltiples sistemas y serán útiles para clarificar la complejidad genética de los sistemas de transporte.

A partir de la cepa MMY2/H3 *gap1* fue aislada la cepa mutante MMY2/H3/LT1 resistente a la inhibición del crecimiento, en medio MA en presencia de TFL 50 μ M. Esta mutante fue seleccionada entre otras 37 resistentes a TFL, por su lento crecimiento en medio sólido sobre leucina como única fuente de nitrógeno y por presentar un disminuído transporte del aminoácido, con respecto al observado en la cepa parental MMY2/H3. Por lo tanto, teniendo en cuenta estas observaciones previas, se consideró de sumo interés estudiar en la cepa mutante MMY2/H3/LT1 las propiedades del transporte de leucina en células crecidas en diferentes medios de cultivo, sus parámetros cinéticos, especificidad y efecto del pH extracelular. Dado que la cepa parental MMY2/H3 ha sido extensamente caracterizada (Stella, 1990; Stella y col, 1992; Kotliar y col, 1994; Sáenz, 1995), la mutante MMY2/H3/LT1 se comparó con la cepa KE3-R23 *gap1* (congénica de MMY2/H3) que fue utilizada como cepa parental en el análisis de tetradas, obtenidas del cruce MMY2/H3/LT1 x KE3-R23.

III. 1. Curvas de crecimiento

Teniendo en cuenta que el estado fisiológico de las células de levadura varía con la fase y el medio de crecimiento, es importante conocer las curvas de crecimiento de las cepas KE3-R23 y MMY2/H3/LT1.

A partir de las curvas de crecimiento realizadas en cada uno de los medios de cultivo MP, MA e YPD, se calcularon los tiempos de generación medios (G). Los resultados obtenidos se presentan en la Tabla III. 1.

Tabla III. 1. Tiempos de generación medios (G)

Medio de cultivo	G(min)	
	KE3-R23	MMY2/H3/LT1
MP	381	406
MA	203	238
YPD	150	160

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

Las curvas de crecimiento, así como los valores de G en cada uno de los medios de cultivo ensayados en ambas cepas, son similares a los hallados en cepas silvestres y mutantes *gap1* crecidas en estas condiciones (Stella, 1990; Bermúdez Moretti, 1994; Sáenz, 1995). En consecuencia el fenotipo de resistencia a TFL de la cepa MMY2/H3/LT1, tanto en el medio MA como en el medio MP, no afectó el transporte y/o utilización de esas fuentes de nitrógeno.

El tiempo requerido para alcanzar el final de la fase exponencial de crecimiento fue de 28-30 horas en el medio MP y de 17-18 horas en los medios MA e YPD. Los ensayos de transporte de leucina se llevaron a cabo en células que alcanzaron ese estadio en el desarrollo celular.

Por otra parte, para determinar el efecto de las mutaciones *let1/let2* en la cepa MMY2/H3/LT1 sobre la velocidad de crecimiento de un cultivo, cuando la fuente de nitrógeno es leucina, se midieron los tiempos de generación en células crecidas en medio MLeu a diferentes concentraciones del aminoácido. Es de esperar que exista una

correlación en la velocidad de crecimiento y la capacidad de transporte de leucina por los sistemas presentes en cada una de las cepas estudiadas.

Como se observa en la Tabla III. 2, tanto en la cepa silvestre MMY2 como en las mutantes *gap1* cepas MMY2/H3 y KE3-R23, las velocidades de crecimiento son aproximadamente constantes a las concentraciones 10 y 4 mM de leucina.

La importancia de la GAP1 en el transporte de leucina 1 mM se pone de manifiesto en el aumento de los valores de G (aproximadamente en 90 min) en las cepas *gap1*.

Las mutaciones *let1let2* presentes en la cepa MMY2/H3/LT1 aumentaron el tiempo de generación en 180 min a las tres concentraciones de leucina ensayadas.

Tabla III. 2. Tiempos de generación medios (G) en medio mínimo leucina

Cepas	G (min)		
	Medio mínimo leucina		
	10 mM	4 mM	1 mM
MMY2	299	289	325
MMY2/H3	319	339	432
KE3-R23	305	326	438
MMY2/H3/LT1	501	518	599

Las células crecieron en medio mínimo con leucina como única fuente de nitrógeno a las concentraciones indicadas en cada caso. Los tiempos de generación se calcularon como se indica en Materiales y Métodos.

III. 2. Entrada e incorporación de L-¹⁴C-leucina

III. 2. 1. Medios complejos

Se estudió la incorporación de L-¹⁴C-leucina en la cepa MMY2/H3/LT1 crecida en medios complejos como Wickerham e YPD conteniendo una fuente de nitrógeno de composición química no definida (Figura III. 1). Para estudiar el transporte de L-¹⁴C-leucina en esta mutante se emplearon las concentraciones externas 0,05 y 1,0 mM del aminoácido, utilizadas para la caracterización de los sistemas S1 y S2 respectivamente.

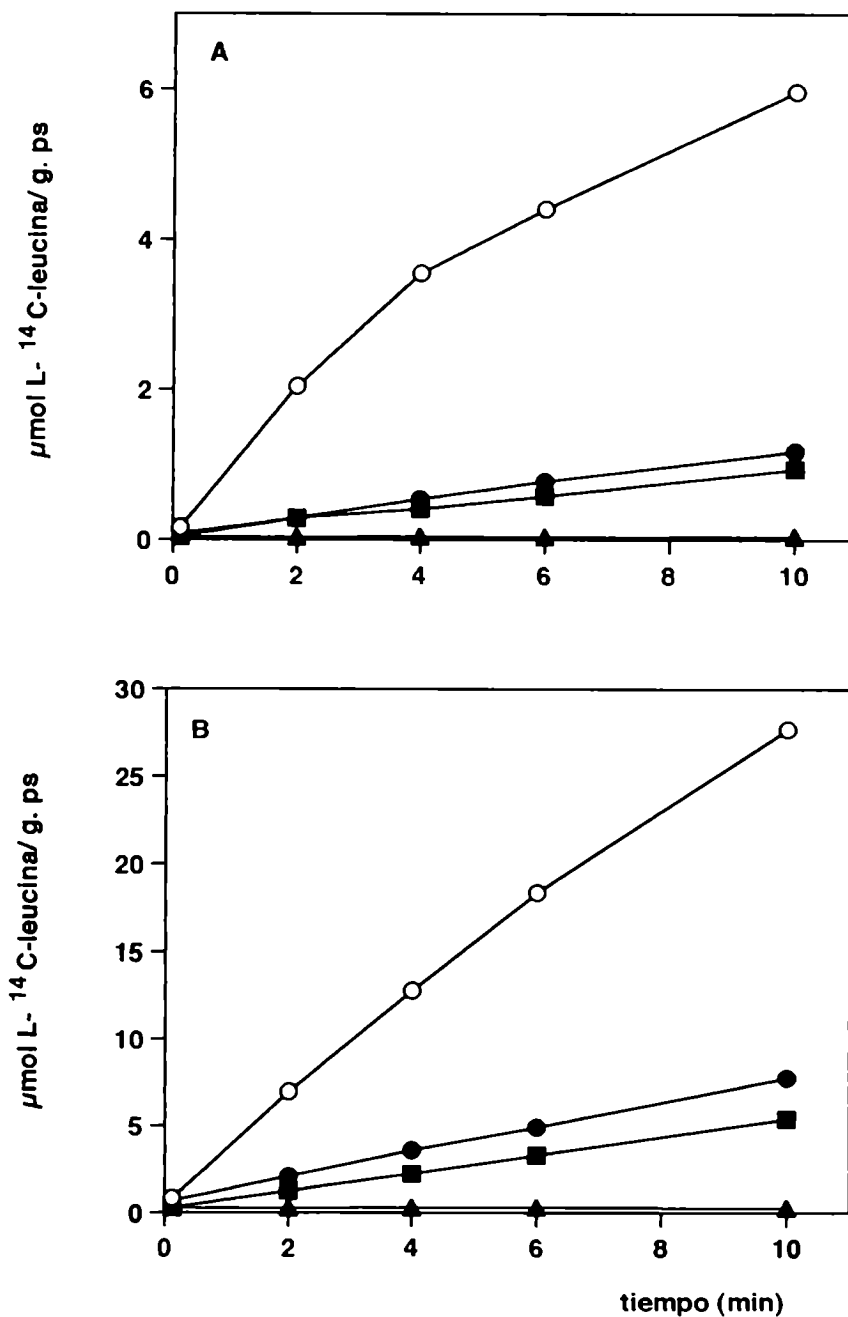


Figura III.1: Incorporación de L-leucina en células de la cepas KE3-R23 (○) y MMY2/H3/LT1(●) crecidas en medio YPD. En la cepa MMY2/H3/LT1 la incorporación de L-leucina se midió a 30 °C (■) y 0 °C (▲) en células crecidas en medio Wickerham. Las concentraciones de L-¹⁴C-leucina externa fueron de 0,05 mM (A) y 1,0 mM (B).

Los valores de la incorporación pueden representarse en forma lineal en ambos medios de cultivo y a las dos concentraciones externas del aminoácido.

La Figura III. 1 muestra que en células crecidas en medio YPD, la cepa MMY2/H3/LT1 presenta una reducida incorporación de L-leucina, comparada con la obtenida en la cepa KE3-R23 para ambas concentraciones ensayadas. En la cepa MMY2/H3/LT1 los valores de L-leucina 0,05 y 1,0 mM incorporados fueron 1,18 y 7,75 $\mu\text{mol/g.ps}$ respectivamente, a los 10 minutos, mientras que en la cepa KE3-R23 fueron 5,96 y 27,72 $\mu\text{mol/g.ps}$.

En células de la cepa MMY2/H3/LT1 crecidas en medio Wickerham se obtuvieron resultados similares a los encontrados por crecimiento de las células en medio YPD. Si se tiene en cuenta que en ambos medios de cultivo y luego de 10 minutos de incubación, la L-leucina permanece distribuída homogéneamente como tal en el reservorio soluble (Ramos y col, 1975), y considerando que el contenido de agua intracelular es de $2 \mu\text{l mg}^{-1}$ (Cooper, 1982), se pueden calcular las concentraciones intracelulares de L-leucina; sin considerar que además del aminoácido incorporado, las células poseen un reservorio endógeno de leucina.

Los valores presentados en la Tabla III. 3 indican que las células de ambas cepas han realizado un proceso de transporte concentrativo del aminoácido.

Tabla III. 3. Concentraciones intracelulares de L-¹⁴C-leucina en los medios complejos

Cepa	L-leucina ext (mM)	Concentración intracelular (mM)	
		YPD	Wickerham
KE3-R23	0,05	2,98	n.d
	1,0	13,86	n.d
MMY2/H3/LT1	0,05	0,59	0,47
	1,0	3,88	2,70

Los valores fueron calculados a partir de los datos de incorporación de L-leucina a 10 minutos de la Figura III. 1.

Por lo tanto, la baja capacidad de transporte de L-leucina en la mutante MMY2/H3/LT1 no se debe a un proceso de difusión, ya que además no se detectó transporte de L-leucina a 0 °C (Figura III. 1). El ligado inespecífico fue de 36 y 271

nmol/g.ps para L-leucina externa 0,05 y 1,0 mM respectivamente, y permaneció constante durante el tiempo de medida.

III. 2. 2. Medios mínimos

En la Figura III. 2 se observan los resultados del estudio de la incorporación de L-leucina 0,05 y 1,0 mM en células de las cepas KE3-R23 y MMY2/H3/LT1, crecidas en medios mínimos conteniendo prolina o iones amonio como fuente de nitrógeno. Comparando los trazados de incorporación de L-leucina 0,05 mM luego de 10 minutos de incubación de ambas cepas, se observa una reducción entre 5 y 2,5 veces en los valores de acumulación del aminoácido en células de la cepa MMY2/H3/LT1, crecidas en los medios MP y MA respectivamente. Las concentraciones intracelulares de L-leucina presentadas en la Tabla III. 4 indican que las células de ambas cepas han concentrado el aminoácido, excepto en células crecidas en medio MA ensayadas a una concentración externa de L-leucina 1,0 mM.

Tabla III. 4. Concentraciones intracelulares de L-¹⁴C-leucina en los medios mínimos

Cepa	L-leucina (mM)	Concentración intracelular (mM)	
		MP	MA
KE3-R23	0,05	2,21	0,51
	1,0	9,54	1,53
MMY2/H3/LT1	0,05	0,47	0,26
	1,0	2,80	0,95

Los valores fueron calculados a partir de los datos de incorporación de L-leucina a 10 minutos de la Figura III. 2.

Por otra parte, puede inferirse de la Figura III. 2 que tanto los valores de incorporación como los de velocidades iniciales de transporte de L-leucina (Tabla III. 5) en la cepa KE3-R23 es fuertemente afectada por la calidad de la fuente de nitrógeno presente en el medio de cultivo. La presencia de una buena fuente de nitrógeno como los iones amonio durante el crecimiento, produce una reducción entre 4-5 veces en la actividad de transporte de leucina a las dos concentraciones externas ensayadas, al compararlas con las máximas desarrolladas en los medios YPD o MP.

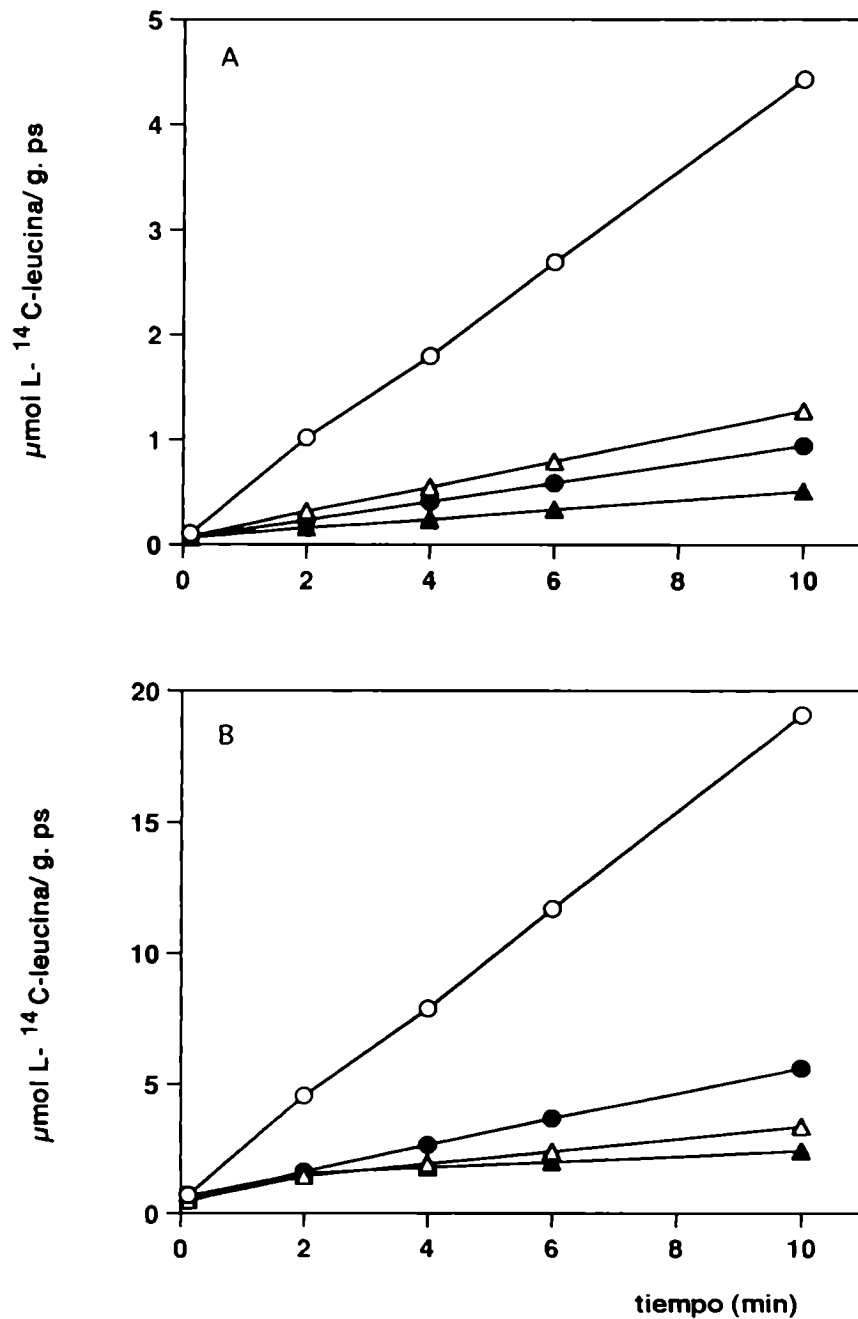


Figura III. 2: Incorporación de L-leucina en células de las cepas KE3-R23 (○, Δ) y MMY2/H3/LT1 (●, ▲) crecidas en medios mínimos. La incorporación de L-leucina se midió en células crecidas en los medios MP (○, ●) y MA (Δ, ▲). Las concentraciones de L-¹⁴C-leucina externa fueron de 0,05 mM (A) y 1,0 mM (B).

Tabla III. 5. Velocidades iniciales de transporte de L-¹⁴C-leucina en los medios mínimos

Cepa	L-leucina _{ext} (mM)	Velocidad inicial ($\mu\text{mol g}^{-1} \text{min}^{-1}$)	
		MP	MA
KE3-R23	0,05	0,43	0,12
	1,0	1,85	0,36
MMY2/H3/LT1	0,05	0,09	0,05
	1,0	0,56	0,28

Los valores fueron calculados a partir de las pendientes de los trazados de la Figura III. 3 hasta 4 minutos.

Esta diferente actividad de transporte de L-leucina dependiente de la fuente de nitrógeno presente en el medio de cultivo, fue demostrada en la cepa parental MMY2/H3 *gap1* (Stella, 1990; Kotliar y col, 1994; Sáenz, 1995).

En la cepa mutante MMY2/H3/LT1 este efecto es menos significativo y se puede observar en la Tabla III. 5 que si bien las velocidades iniciales de transporte de L-leucina 1,0 mM son prácticamente las mismas en células de ambas cepas crecidas en medio MA, en la cepa KE3-R23 se produce una inhibición de 5 veces, mientras que en la cepa MMY2/H3/LT1 es de 2 veces, con respecto a los valores obtenidos en medio MP.

III. 3. Efecto de activadores e inhibidores metabólicos

Para determinar la dependencia energética del transporte de leucina en la cepa MMY2/H3/LT1, se midió su entrada en presencia de glucosa y etanol, y de inhibidores del metabolismo energético. En la Tabla III. 6 muestran los resultados obtenidos. La presencia de glucosa o etanol en el medio de reacción no estimuló el transporte de L-leucina, en células energizadas.

El protonóforo DNP (dinitrofenol) y la NaN_3 (azida sódica) que inhibe la transferencia de electrones de la cadena respiratoria a nivel de la citocromo oxidasa, inhibieron el transporte de L-leucina entre un 36-53%.

Sin embargo, el consumo simultáneo de glucosa, previno en cierto grado la inhibición del transporte por DNP y NaN_3 .

Tabla III. 6. Efecto de activadores e inhibidores del metabolismo energético

Adiciones (mM)	% Inhibición	
	L- ¹⁴ C-leucina	
	0,05 mM	1,0 mM
glucosa 5	0	2
etanol 10	0	12
DNP 0,05	44	53
NaN ₃ 0,05	38	36
glucosa 5 + DNP 0,05	12	28
glucosa 5 + NaN ₃ 0,05	14	19

Células energizadas de la cepa MMY2/H3/LT1 crecidas en medio Wickerham. Los valores controles del transporte a 3 minutos de L-¹⁴C-leucina 0,05 y 1,0 mM fueron 0,34 y 1,70 $\mu\text{mol g}^{-1}$

III. 4. Parámetros cinéticos

Se investigaron las cinéticas del transporte de L-leucina en células de ambas cepas crecidas en los medios MP (Figura III. 3) y MA (Figura III. 4). Los valores de los parámetros cinéticos K_T y $J_{\text{máx}}$ se presentan en la Tabla III. 7.

La velocidad inicial de transporte de L-leucina en función de su concentración externa produjo curvas hiperbólicas.

La representación de los datos, según el análisis de Eadie-Hofstee (v en función de v/S), es claramente bifásica en células de la cepa KE3-R23 crecidas en los dos medios de cultivo, indicando la operación de dos sistemas cinéticamente caracterizables S1 y S2 (Figuras III. 3 - III. 4). Los valores de K_T y $J_{\text{máx}}$ son semejantes a los descriptos en la cepa MMY2/H3 (Kotliar y col, 1994).

El mismo tipo de análisis de los datos cinéticos obtenidos para la cepa MMY2/H3/LT1 condujo a una representación lineal, consistente con la operación de un solo sistema obedeciendo una cinética de Michaelis-Menten. No se detectó actividad de transporte de leucina correspondiente al sistema S1 de alta afinidad en células crecidas en ambos medios de cultivo. El valor de K_T determinado en la cepa mutante TFL^R es similar al del sistema S2 descrito en la cepa KE3-R23, pero el valor de $J_{\text{máx}}$ fue sustancialmente inferior en células provenientes del medio MP aunque similar a las provenientes del medio MA.

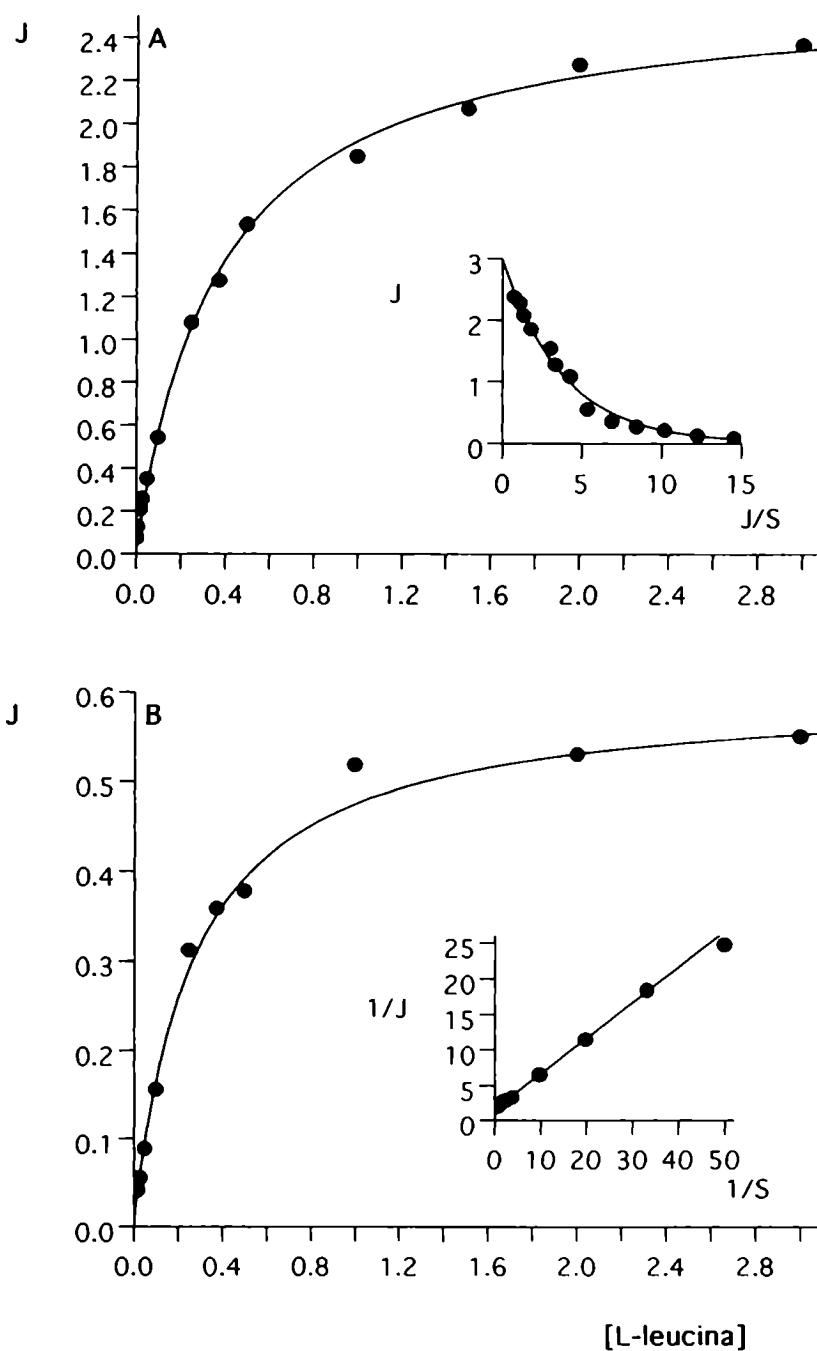


Figura III. 3: Cinética de transporte de L-leucina en células de las cepas KE3-R23 (A) y MMY2/H3/LT1 (B) crecidas en medio MP.

Inset: (A) Representación de Eadie-Hofstee.

(B) Representación de Lineweaver-Burk.

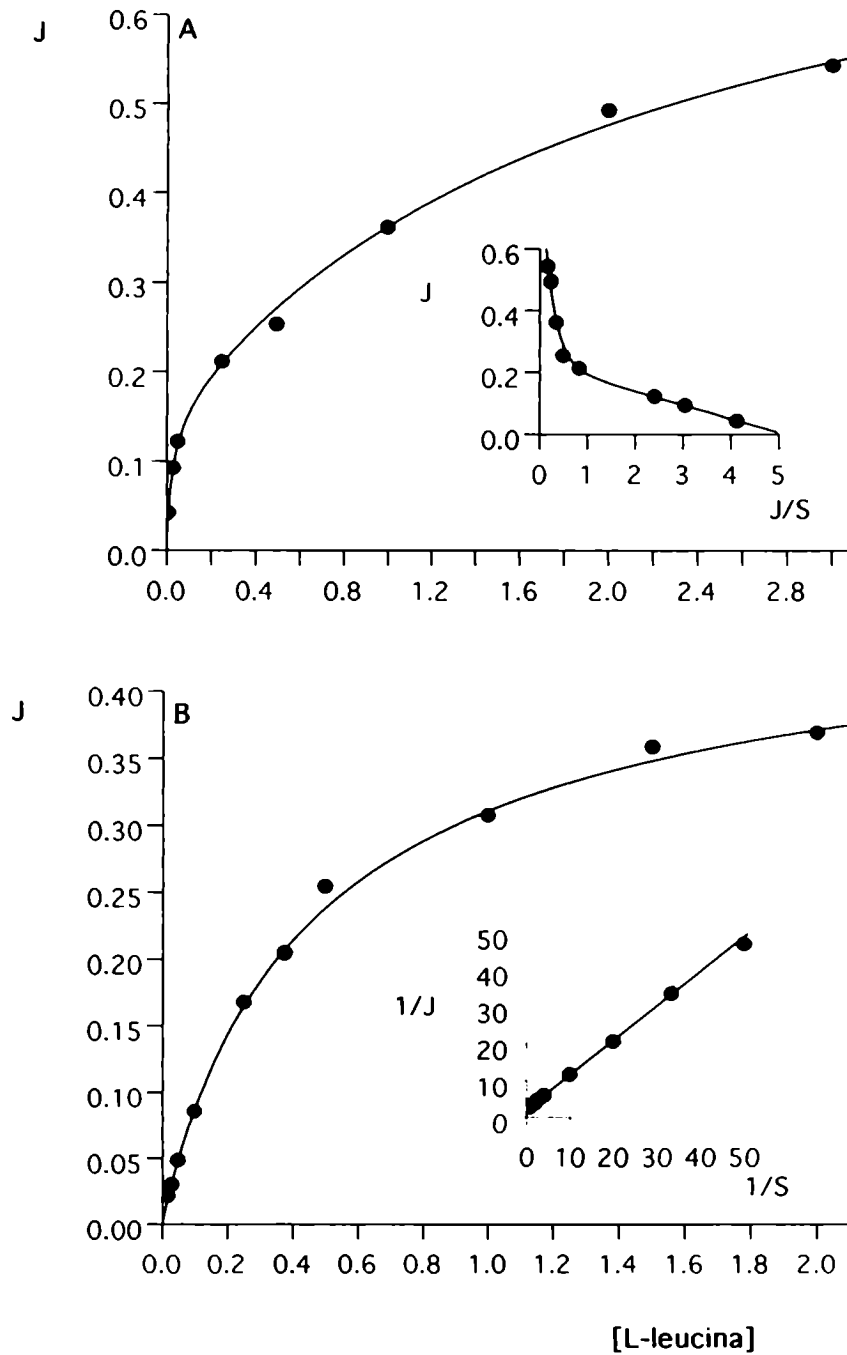


Figura III. 4: Cinética de transporte de L-leucina en células de las cepas KE3-R23 (A) y MMY2/H3/LT1 (B) crecidas en medio MA.

Inset: (A) Representación de Eadie-Hofstee.

(B) Representación de Lineweaver-Burk.

Tabla III. 7. Parámetros cinéticos del transporte de L-leucina

Cepas	Medio de cultivo	K_{T1} (μM)	$J_{\text{máx } 1}$ ($\mu\text{mol min}^{-1} \text{g}^{-1}$)	K_{T2} (mM)	$J_{\text{máx } 2}$ ($\mu\text{mol min}^{-1} \text{g}^{-1}$)
KE3-R23	MP	47	0,71	0,38	2,64
KE3-R23	MA	51	0,25	0,53	0,57
MMY2/H3/LT1	MP			0,31	0,64
MMY2/H3/LT1	MA			0,41	0,44

Los valores de los parámetros cinéticos se calcularon a partir de las representaciones de las Figuras III. 3 y III. 4.

Estos resultados sugieren que la resistencia a TFL en la cepa MMY2/H3/LT1 se relaciona con la pérdida del sistema de alta afinidad de transporte de leucina, mutación *let1*, mientras que la disminución en la actividad de transporte de L-leucina por el sistema S2, produciendo la ausencia de desrepresión en las células crecidas en medio MP, con la mutación *let2*.

III. 5. Especificidad

Con el fin de estudiar la especificidad del sistema de baja afinidad-baja capacidad presente en la cepa MMY2/H3/LT1, se llevaron a cabo experimentos de la entrada de L-¹⁴C-leucina en presencia de varios aminoácidos no radiactivos, agregados individualmente a la mezcla de reacción.

Los resultados de la Tabla III. 8 indican que en las dos cepas el transporte de leucina es fuertemente inhibido por los aminoácidos estructuralmente relacionados, isoleucina y valina así también como por metionina y el análogo de cadena lineal de leucina, norleucina; los porcentajes de inhibición (50-75%) aumentan con el incremento de la concentración externa de leucina.

Sin embargo, DL-TFL produce una inhibición diferencial sobre el transporte de leucina a bajas concentraciones: 40% en la cepa KE3-R23 y 8% en la mutante MMY2/H3/LT1. Para la concentración externa 1,0 mM los porcentajes de inhibición son similares (50%).

Tabla III. 8. Efecto de varios aminoácidos sobre el transporte de L-leucina

Adiciones	% Inhibición			
	L- ¹⁴ C-leucina 0,05 mM		L- ¹⁴ C-leucina 1,0 mM	
	KE3-R23	MMY2/H3/LT1	KE3-R23	MMY2/H3/LT1
L-leucina	68	44	79	71
L-isoleucina	63	42	78	72
L-valina	36	23	65	69
L-norleucina	75	55	86	70
DL-TFL	40	8	48	49
L-metionina	53	43	69	69
L-prolina	0	2	15	18
L-citrulina	1	3	9	6
L-alanina	39	-	65	61
L-serina	48		74	71
L-norvalina	62		-	74
L-fenilalanina	39			65
L-treonina	43			66
L-glutamato	18			48
L-aspartato	20			51
L-glutamina	20			47
L-asparagina	55			61
L-arginina	9			25
L-histidina	2			19
L-lisina	10	-	-	11

Las células crecieron en medio MP. Los valores controles luego de 3 minutos de incubación fueron: 1,44 y 0,31 $\mu\text{mol g}^{-1}$ para las cepas KE3-R23 y MMY2/H3/LT1 respectivamente para la concentración externa de L-leucina 0,05 mM, y de 6,28 y 1,96 $\mu\text{mol g}^{-1}$ para las cepas KE3-R23 y MMY2/H3/LT1 respectivamente para la concentración externa de L-leucina 1,0 mM.

Por otra parte, citrulina que es transportada exclusivamente por el sistema GAP1 (Grenson y col, 1970) y prolina que es transportada por el sistema altamente específico PUT4 (Lasko y Brandriss, 1981) no produjeron efectos inhibitorios significativos. Ambos aminoácidos fueron utilizados como controles negativos.

Teniendo en cuenta resultados previos (Kotliar y col., 1994) y que en la cepa KE3-R23 *gap1*, excepto citrulina y prolina, el resto de los aminoácidos inhibieron el transporte de leucina a las dos concentraciones externas ensayadas, se decidió indagar el efecto de otros aminoácidos sobre el transporte de L-leucina 0,05 mM en la cepa KE3-R23 y de L-leucina 1,0 mM en la cepa MMY2/H3/LT1 (Tabla III. 8).

En las dos cepas, el transporte de leucina fue inhibido por alanina, norvalina, fenilalanina, treonina, serina y asparagina entre 39-74%. En cambio, glutamina, glutamato y aspartato causaron 50% de inhibición del transporte de leucina en la cepa MMY2/H3/LT1 y solamente 20% de inhibición en la cepa KE3-R23. Histidina, lisina y arginina, no produjeron inhibiciones significativas.

III. 6. Efecto del pH externo

Se investigó la dependencia de la actividad de transporte de L-leucina con el pH extracelular (pH_e), en células de ambas cepas crecidas en medio MP. La respuesta a cambios en el pH_e fue diferente en las dos cepas, como puede observarse en la Figura III. 5.

En la cepa KE3-R23, la actividad de transporte de L-leucina a las dos concentraciones externas ensayadas depende de las variaciones de pH_e en el rango 3,5-6,0. Los valores máximos se obtuvieron a pH 5,5 y 6,0 para L-leucina 0,05 y 1,0 mM respectivamente, y corresponden a un incremento de aproximadamente el 50% en los valores de entrada de L- ^{14}C -leucina. En el rango de pH_e 4,5-6,0 los valores de entrada del aminoácido no se modificaron significativamente.

En la cepa mutante MMY2/H3/LT1, el transporte de L-leucina 0,05 mM es óptimo a pH 3,5 que corresponde a un valor de entrada de $0,40 \mu\text{mol g}^{-1}$, un 70% mayor que el obtenido a pH 6,0. El transporte de L-leucina 1,0 mM depende débilmente del pH_e , con una entrada máxima a pH 4,5.

III. 7. Determinación del pH intracelular

A pH_e 4,5 el valor de pH intracelular (pH_i), determinado por el método de distribución del ácido benzoico (Bongioanni y Ramos, 1988) fue de 6,16, siendo ΔpH de 1,66 ó 98 mV. Estos valores son similares a los determinados para la cepa parental MMY2/H3 (Stella y col, 1992, Sáenz, 1995) y al de otras cepas de levadura (de la Peña y col, 1982; Bongioanni y Ramos, 1988).

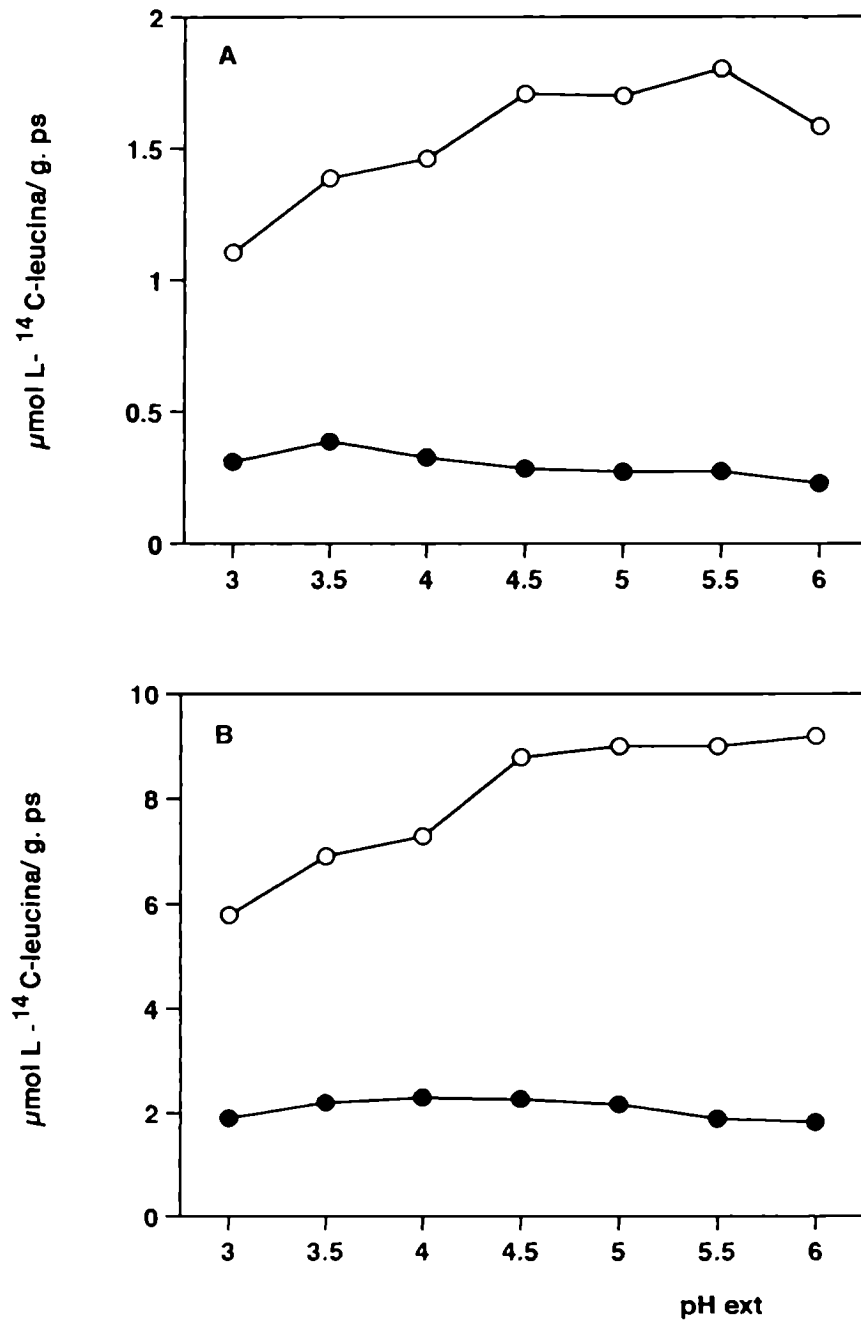


Figura III. 5. Efecto del pH externo sobre el transporte de L-leucina en las cepas KE3-R23 (o) y MMY2/H3/LT1(●). La entrada de L-leucina se midió a 3 minutos en células crecidas en medio MP. Las concentraciones de L-¹⁴C-leucina externa fueron de 0,05 mM (A) y 1,0 mM (B).

III. 8. Actividad de la H⁺-ATPasa

Se ha demostrado que el transporte de aminoácidos en levadura es un proceso impulsado por un gradiente electroquímico de protones, generado por la H⁺-ATPasa de membrana plasmática (Horák, 1986). Para establecer si el transporte disminuído de L-leucina en la mutante MMY2/H3/LT1 se debe a una baja actividad de la H⁺-ATPasa, se midió su actividad en función de la salida de protones después de la adición de glucosa 5 mM, en células suspendidas en FHK 4 mM (Figura III. 6), concentración que permite una medida eficiente de la acidificación del medio externo (Stella, 1990).

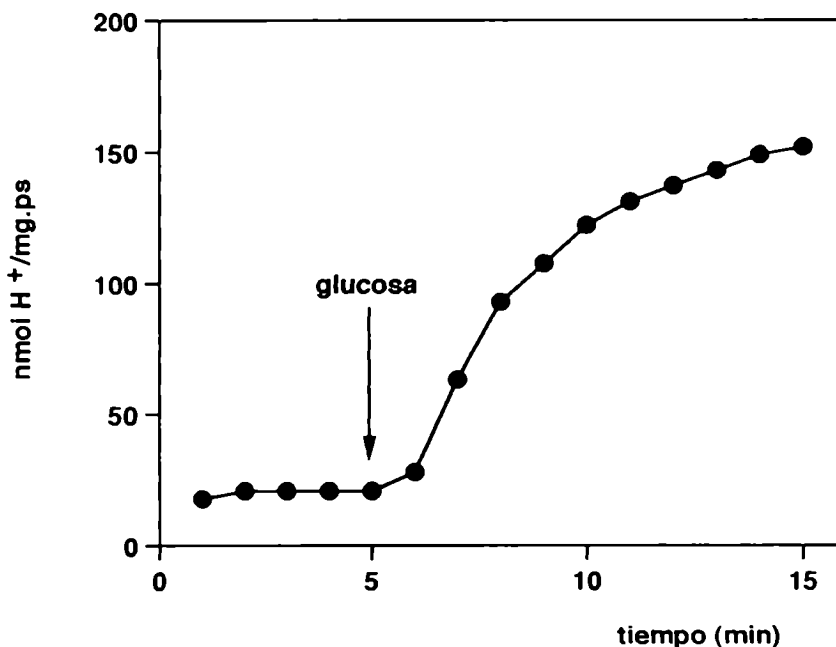


Figura III. 6. Medida de la actividad de la H⁺-ATPasa de membrana plasmática en la cepa mutante MMY2/H3/LT1.

Para medir la salida de protones, células crecidas en medio MP se ayunaron como se describió en Materiales y Métodos y se suspendieron en FHK 4 mM en presencia de glucosa 5 mM a 30 °C.

En células ayunadas el agregado de glucosa 5 mM provoca una salida neta de protones que aumenta con el tiempo de incubación (Figura III. 6), y que luego de 10 minutos corresponde a 152 nmol/mg.ps, siendo este valor semejante al encontrado por Stella (1990) en la cepa diploide JB65 (169 nmol/mg.ps) en las condiciones en que el transporte de L-leucina es mediado por los sistemas S1 y S2.

III. 9. Determinación del contenido intracelular de leucina

Baichwal y col. (1983) aislaron una mutante SK103, resistente a TFL, en la que la enzima α -IPM (α -isopropil malato) sintetasa, del camino biosintético de leucina y codificada por el gen *LEU4*, es insensible a la retroinhibición por leucina, el producto final de la vía. Las mutantes conteniendo el alelo *LEU4^{fbr}* producen 15 veces más leucina que una cepa normal y por lo tanto el aumento del reservorio intracelular de leucina, está asociado a la resistencia a la inhibición del crecimiento en presencia de TFL. Teniendo en cuenta que cuando las células son precargadas con un dado aminoácido, su transporte posterior disminuye, sería posible entonces, que una elevada concentración de leucina intracelular produjera la inhibición de las permeasas de leucina reduciendo su transporte.

Con el fin de descartar la posible presencia del alelo *LEU4^{fbr}*, en la cepa mutante MMY2/H3/LT1, se determinaron los reservorios intracelulares solubles de aminoácidos en esta cepa y en su parental MMY2/H3 y también en la cepa KE3-R23 (Tabla III. 9).

Tabla III. 9. Concentraciones intracelulares de aminoácidos libres

Aminoácidos (mM)	KE3-R23	MMY2/H3	MMY2/H3LT1
leucina	1,37	0,23	0,38
isoleucina	2,12	0,43	0,86
valina	7,27	0,85	1,30
glicina/alanina	40,23	7,18	5,27
treonina/serina	42,99	2,35	2,14
fenilalanina	0,67	0,06	n.d
metionina	0,50	n.d	n.d
tirosina	2,63	0,10	0,51
histidina	4,17	0,56	0,56
lisina	n.d	2,15	3,28
arginina	4,34	3,34	4,34
prolina	13,52	13,48	1,62
aspartato	5,99	3,66	4,23
glutamato	36,60	47,81	38,34

Las células crecieron en medio MP y el reservorio intracelular de aminoácidos se analizó como se describió en Materiales y Métodos. n.d: no determinado.

En la Tabla III. 9, se observa que los valores de las concentraciones de leucina, isoleucina y valina, no difieren en más de dos veces para las cepas MMY2/H3 y su mutante TFL^R MMY/H3/LT1. Los reservorios de los otros aminoácidos mostraron diferencias similares entre las cepas, excepto para prolina. Por consiguiente, es improbable que la cepa mutante MMY2/H3/LT1 contenga el alelo *LEU4^{fb}*

Las diferencias más significativas se detectaron en el contenido de la mayoría de los aminoácidos analizados entre las dos mutante *gap1* cepas MMY2/H3 y KE3-R23. Sin embargo, a pesar de estas diferencias el transporte de L-leucina no resultó afectado, ya que los parámetros cinéticos de ambas cepas son similares.

III. 10. Crecimiento celular en placa y transporte de aminoácidos

Las células de levadura pueden utilizar como nutrientes para el mantenimiento de sus funciones fisiológicas, una amplia variedad de compuestos nitrogenados y en especial, los aminoácidos. El transporte de estos nutrientes exógenos al interior de las células, constituye entonces el primer paso para su metabolización posterior.

Una metodología utilizada para indagar las consecuencias fisiológicas de una mutación que afecta el transporte de uno o varios aminoácidos, es evaluar su crecimiento cuando éstos son utilizados como fuente de nitrógeno. A este respecto, el crecimiento puede ser imposible, lento o no alterado como consecuencia del tipo de mutación y de la actividad de las permeasas de aminoácidos.

III. 10. 1. Aminoácidos como fuente de nitrógeno

Se analizó el crecimiento celular en medio sólido, utilizando diferentes aminoácidos como únicas fuentes de nitrógeno. Los resultados obtenidos para las cepas estudiadas pueden observarse en la Tabla III. 10.

Los resultados demostraron que la levadura *S. cerevisiae* no utiliza lisina como fuente de nitrógeno (Kreger-van Rij, 1984) y tampoco el análogo de leucina γ -metil-leucina. Todas las cepas mutantes crecieron de manera similar a la cepa normal MMY2 cuando prolina, arginina, glutamina, asparagina, glutamato, aspartato, alanina y α -aminobutirato, fueron las fuentes de nitrógeno.

Tabla III. 10. Crecimiento celular con aminoácidos como únicas fuentes de nitrógeno

Aminoácido	MMY2 normal	MMY2/H3 <i>gap1</i>	KE3-R23 <i>gap1</i>	MMY2/H3/LT1 <i>gap1let1let2</i>	MMY2/LT1/GAP1 <i>let1let2</i>
prolina	3/4	3	3	3	3
arginina	5	5	5	5	5
citrulina	4	1	1	1	4
gutamina	4	4	4	4	4
asparagina	5	5	5	5	5
glutamato	4	4	4	4	4
aspartato	4	4	4	4	4
α -aminobutirato	4	4	4	4	4
tirosina	4	2/3	2/3	2/3	4
triptofano	5	3/2	3/2	3/2	5
alanina	3	3	3	3	3
leucina	4	3	3	1	3
isoleucina	4	3	3	0	4
valina	4	3/4	3/4	1	4
norleucina	3	3	3	2/1	3
norvalina	4/3	3	3	2	4/3
treonina	4	3	3	1	4
serina	3	3	3	1	3/4
metionina	3	2/3	2/3	1	2/3
fenilalanina	3	2	2	0	3
cisteína	2/3	2/3	2/3	2	2/3
γ -metil-leucina	0	0	0	0	0
lisina	0	0	0	0	0

Las células crecieron en medio mínimo sólido durante 3 días, con la adición de un único aminoácido (1mM), como fuente de nitrógeno. La producción del crecimiento se evaluó por medio de una escala empírica. Crecimiento 5: muy intenso; 4: denso; 3: moderado; 2: escaso; 1: trazas y 0: no crecimiento.

Por lo tanto, la mutación *gap1*, las mutaciones *let1let2* o la combinación *gap1let1let2* no afectaron la capacidad de transporte de los aminoácidos mencionados anteriormente.

Por otro lado, las cepas mutantes *gap1* no crecieron en presencia de citrulina, en contraste con la cepa normal MMY2 y la revertante MMY2/LT1/GAP1, resultado esperado ya que este aminoácido es transportado casi exclusivamente por el sistema GAP1 (Grenson y col., 1970).

La mutación *gap1* produjo un crecimiento algo más lento sobre el resto de las fuentes de nitrógeno estudiadas, en particular sobre tirosina y triptófano sobre los cuales fueron observados los efectos más significativos. En cambio, en la revertante *let1let2* no se observaron diferencias en el crecimiento con respecto a la cepa normal, lo que demuestra la importancia de la GAP1 en el transporte de estos aminoácidos.

Sin embargo, a diferencia de lo observado en las mutantes *gap1*, la mutante *gap1let1let2* prácticamente no crece sobre las siguientes fuentes de nitrógeno: leucina, isoleucina, valina, treonina, serina, metionina y fenilalanina y presenta un más lento crecimiento sobre norleucina y norvalina. Por lo tanto, las mutaciones *let* afectaron la actividad de transporte y/o utilización de un amplio grupo de aminoácidos, tanto hidrofóbicos como hidrofílicos, en el caso de serina y treonina.

III. 10. 2. En presencia de análogos tóxicos

Otra metodología que se utilizó para evaluar la funcionalidad de las permeasas específicas de aminoácidos, fue el análisis del efecto de análogos tóxicos de aminoácidos sobre el crecimiento celular. Cepas normales son sensibles a la presencia de análogos tóxicos en el medio de cultivo y no crecen, mientras que la resistencia a la inhibición del crecimiento puede ser causada por un defecto en la permeabilidad, que también afecta la incorporación normal del aminoácido o por una mutación relacionada con el proceso de regulación de la actividad de transporte de la permeasa, que puede ser específica para una dada permeasa o causar un efecto pleiotrópico sobre la actividad de varias permeasas.

En la Tabla III. 11 se muestran los resultados obtenidos.

Tabla III. 11. Crecimiento celular en presencia de análogos tóxicos

Medio MP	MMY2 normal	MMY2/H3 <i>gap1</i>	KE3-R23 <i>gap1</i>	MMY2/H3/LT1 <i>gap1let1let2</i>	MMY2/LT1/GAP1 <i>let1let2</i>
L-canavanina ¹	S	S	S	S	S
β -2-tienilalanina ²	S	S	S	R	S
L-etionina ³	S	S	S	R	S
Azaserina ³	S	S	S	R	S
D-norleucina ⁴	S	R	R	R	S
Azaleucina ³	S	R	R	R	S
β -cloroalanina ²	S	S	S	S	S
DL-TFL ⁵	S	S	S	R	S

Las células crecieron durante 48 hs en medio mínimo sólido con prolina 10 mM como fuente de nitrógeno y las adiciones individuales indicadas a las siguientes concentraciones: (1) 40 μ g/ml; (2) 100 μ g/ml; (3) 50 μ g/ml; (4) 9,7 mM y (5) 100 μ M. El crecimiento de las células se comparó con el producido en medio MP sólido en ausencia de análogo tóxico. R: resistentes, S: sensibles.

Todas las cepas resultaron sensibles a la presencia de L-canavanina y β -cloroalanina, análogos tóxicos de arginina y alanina respectivamente y por lo tanto, no hubo crecimiento celular, indicando que las mutaciones *gap1*, *let* o la combinación *gap1let* no afectaron la permeasa específica de arginina (Grenson y col., 1966) y el transporte de alanina.

Las cepas normal MMY2 y la revertante MMY2/LT1/GAP1 *let1let2*, son también sensibles a la presencia en el medio de cultivo de los demás análogos tóxicos ensayados, indicando que éstos son transportados por la GAP1. Únicamente las cepas con actividad de la permeasa general de aminoácidos, fueron sensibles a la presencia de D-norleucina y azaleucina y no crecieron. Por lo tanto, la GAP1 es el sistema principal de su transporte ya que, las cepas que son *gap1* fueron resistentes y crecieron.

Los análogos tóxicos de fenilalanina, metionina y serina: β -2-tienilalanina, L-etionina y azaserina, respectivamente, produjeron la inhibición del crecimiento en las

cepas *gap1*, debido a la presencia de sistemas de transporte más específicos para estos aminoácidos.

En contraste, la cepa MMY2/H3/LT1 *gap1let1let2* es completamente resistente a estos análogos tóxicos. Estos resultados concuerdan con los ensayos de crecimiento, utilizando los aminoácidos anteriores, individualmente, como única fuente de nitrógeno y que las mutaciones *let* afectaron la actividad de transporte de estos aminoácidos.

Además, en medio MA con TFL las cepas MMY2/H3/LT1 *gap1let1let2* y MMY2/LT1/GAP1 *let1let2* son resistentes, indicando que la GAP1 se encuentra reprimida en la revertante y que presenta el mismo fenotipo que la cepa MMY2/H3/LT1 *gap1let1let2*.

Gits y Grenson (1967), caracterizaron dos sistemas específicos para el transporte de metionina en medio MA. El sistema de alta afinidad es inhibible por etionina y utilizaron este análogo para obtener mutantes defectivas en este sistema denominadas *metp1*. El transporte de leucina, isoleucina, valina, serina y treonina, entre otros aminoácidos, no se vió afectado por la mutación *mtp1* (*metp1*), siendo entonces la permeasa de alta afinidad altamente específica para metionina. Estos autores sugieren que el sistema de transporte de metionina de baja afinidad podría corresponder a una permeasa que además de metionina transporta serina y treonina.

Teniendo en cuenta los resultados de Gits y Grenson (1967) y los del presente trabajo, es más probable que el gen *LET2* esté relacionado con el sistema de transporte de metionina de baja afinidad descrito por los autores mencionados.

Como se comentó en la Introducción, han sido aisladas varias mutaciones que afectan el transporte de leucina entre otros aminoácidos. Las mutaciones alélicas *aap1* (Surdin y col., 1965), *apf1* (Grenson y Hennaut, 1971) y *shr3* (Ljungdahl y col., 1992), aisladas en varios laboratorios como resistentes a una variedad de análogos tóxicos de aminoácidos, afectan la actividad de la permeasa general de aminoácidos y también la actividad de varias permeasas específicas de aminoácidos, con disminución de los valores de $J_{m\acute{a}x}$, sin modificar apreciablemente los valores de K_T (reducido transporte de prolina, arginina, lisina, histidina, glutamato, leucina, metionina, serina y valina) (Grenson y Hennaut, 1971). La característica distintiva de esas mutantes, es que no pueden crecer con prolina como fuente de nitrógeno y, además, dobles mutantes *gap1apf1* son incapaces de crecer con glutamato o aspartato como fuentes de

nitrógeno. Las características fenotípicas de la cepa MMY2/H3/LT1 *gap1let1let2* (Tabla III. 9), no son compatibles con la presencia de esas mutaciones.

La mutante MMY2/H3/LT1 es también diferente de las mutantes *raa* descritas por McCusker y Haber (1990), que son resistentes a TFL y otros análogos tóxicos de aminoácidos, cuando las células crecen en medio mínimo con urea, pero no cuando crecen con prolina como fuente de nitrógeno. Más aún, la mutante *raa4* no crece cuando prolina es la fuente de nitrógeno.

Todas las cepas analizadas son competentes respiratorias, ya que además de crecer con prolina cuya metabolización es mitocondrial, presentan buen crecimiento en medio YPGlicerol 3%, descartándose entonces alguna lesión mitocondrial como la observada en mutantes *rho*⁻, que presentan una disminución en la actividad de transporte de leucina (Ramos y col., 1975).

Por otra parte, Stella y col. (1995) obtuvieron a partir de una cepa *gap1leu2* una mutante resistente a TFL y deficiente en el transporte de leucina, cepa *gap1 leu2 lep1*, que recobró la actividad de transporte de leucina al transformarla con una biblioteca de fragmentos de ADN. La secuencia del fragmento clonado (*LEP1*) es homóloga con la del gen *SAC3* (Bauer y Kölling, 1996). La mutación *sac3*, cuyo fenotipo de crecimiento es la sensibilidad a bajas temperaturas, suprime otra mutación, *act1-1*, termosensible a 37 °C que produce deficiencia en la biosíntesis de actina (Novick y col., 1989). De esta manera, el desarrollo de la resistencia a TFL resultó en defectos en un gen que indirectamente afectó el transporte de leucina. El fragmento clonado *LEP1/SAC3* no restauró el transporte de leucina en la cepa MMY2/H3/LT1 (Stella, comunicación personal) y adicionalmente, todas las cepas de este trabajo crecen tanto a 14 °C en medio YPD, como a 37 °C en medio MP, descartándose la presencia de mutaciones termosensibles.

III. 11. Conclusiones

En este capítulo se caracteriza el transporte de L-leucina en la cepa mutante MMY2/H3/LT1 *gap1let1let2*. Se determinó que:

- tanto en los medios MA y MP, como en el medio complejo YPD, las velocidades de crecimiento celular son similares a las de cepas silvestres y *gap1*, mientras que en medio mínimo con leucina a diferentes concentraciones, como única fuente de

nitrógeno, el tiempo de generación aumenta en 180 min con respecto al de las mutantes *gap1*;

- la actividad de transporte de L-leucina disminuyó considerablemente, tanto en células crecidas en el medio mínimo con prolina, como en las provenientes de los medios complejos YPD y Wickerham, a las dos concentraciones de L-leucina ensayadas, al compararlas con las obtenidas para la cepa KE3-R23 *gap1*; en esas condiciones experimentales el transporte de L-leucina es concentrativo;

- en medio MA la actividad de transporte de L-leucina se redujo sólo cuando se ensayó a la concentración 0,05 mM al compararla con la obtenida en la cepa KE3-R23 *gap1*, mientras que a la concentración 1,0 mM se obtuvieron valores similares en ambas cepas. En este último caso el aminoácido no es concentrado por las células;

- si bien la actividad de transporte de L-leucina es el doble en células crecidas en medio MP que en medio MA, la dependencia del transporte de L-leucina por la fuente de nitrógeno presente en el medio de cultivo es menos importante que la observada para la cepa parental;

- por estudios cinéticos, tanto en células crecidas en medio MP como en medio MA, un único sistema media el transporte de L-leucina, siendo de baja afinidad y baja capacidad, no detectándose actividad de la permeasa S1, en contraste con los dos sistemas caracterizados en la cepa parental;

- el valor de la constante de afinidad es similar al determinado para el sistema S2 de la cepa parental pero de menor $J_{m\acute{a}x}$ para células crecidas en medio MP.

- el transporte de leucina es inhibido por DNP y por NaN_3 ;

- el transporte de leucina es inhibido no sólo por los aminoácidos de cadena ramificada y los análogos de cadena lineal norleucina y norvalina, sino también tanto por aminoácidos hidrofóbicos como alanina, metionina y fenilalanina, como por los hidrofílicos serina, treonina, glutamina y asparagina y los aminoácidos ácidos glutámico y aspártico;

- el efecto inhibitorio diferencial de TFL sobre el transporte de L-leucina 0,05 y 1,0 mM son concordantes con la operación de solamente un sistema de baja afinidad;

- el transporte de L-leucina es poco dependiente de las variaciones del pH;

- ni el pHi determinado a pHe 4,5, ni la actividad de la H⁺-ATPasa se encuentran modificados, por lo cual es improbable que el fenotipo de resistencia a TFL haya afectado el potencial de membrana o el gradiente electroquímico de protones;

- el análisis genético de la resistencia a TFL en 14 tetradas obtenidas del cruce MMY2/H3/LT1 x KE3-R23, indica que al menos dos genes, que segregan independientemente son responsables del desarrollo de una completa resistencia a TFL. Los putativos genes mutantes responsables de la resistencia a TFL se designaron *let1* y *let2*;

- por los estudios cinéticos y el análisis genético, la permeasa de leucina de alta afinidad y baja capacidad es primariamente responsable de la acumulación de TFL a niveles tóxicos, ya que este sistema no es detectado en la mutante MMY2/H3/LT1 resistente a TFL;

- el componente mayor de la resistencia a TFL está asociado con la mutación *let1* que inactiva la función de transporte de alta afinidad;

- la disminución de la velocidad de transporte de leucina por el sistema S2 de baja afinidad, en células crecidas en medio MP, es atribuída a la mutación *let2*;

- por los estudios de crecimiento en placa con diferentes aminoácidos como única fuente de nitrógeno y en presencia de análogos tóxicos, las mutaciones *let* afectaron la actividad de transporte y/o la utilización de isoleucina, valina, metionina, fenilalanina, treonina y serina;

- las características fenotípicas de la mutante MMY2/H3/LT1 no son compatibles con la presencia de otras mutaciones: *apf1* (*aap1*, *shr3*); *raa*, *rho*⁻; *lep1* (*sac3*) y *LEU*^{fbr};

**Sistemas transportadores de L-isoleucina y L-valina en las cepas
MMY2, MMY2/H3, KE3-R23, MMY2/H3/LT1 y MMY2/LT1/GAP1**

	Página
IV. 1. Entrada e incorporación de L- ¹⁴ C-isoleucina y L- ¹⁴ C-valina	66
IV. 1. 1. Cepa normal MMY2	66
IV. 1. 1. 1. Recuperación y análisis del ¹⁴ C acumulado	70
IV. 1. 2. Cepas <i>gap1</i> : MMY2/H3 y KE3-R23	71
IV. 1. 3. Cepa MMY2/H3/LT1 <i>gap1let1let2</i>	79
IV. 1. 4. Cepa MMY2/LT1/GAP1 <i>let1let2</i>	83
IV. 2. Análisis cinético del transporte de L-isoleucina y L-valina	86
IV. 2. 1. Parámetros cinéticos del transporte de L- isoleucina	86
IV. 2. 2. Parámetros cinéticos del transporte de L- valina	89
IV. 3. Conclusiones	93

IV. Sistemas transportadores de L-isoleucina y L-valina en las cepas MMY2, MMY2/H3, KE3-R23, MMY2/H3/LT1 y MMY2/LT1/GAP1

Teniendo en cuenta que la cepa MMY2/H3/LT1 presenta un crecimiento deficiente sobre L-isoleucina y L-valina, se consideró de interés la caracterización de los sistemas transportadores de estos aminoácidos y su relación con los sistemas de transporte de L-leucina. Para conocer la contribución de la permeasa general de aminoácidos, GAP1, en el transporte de isoleucina y valina, se utilizaron las cepas MMY2 normal y las mutantes *gap1* MMY2/H3 y KE3-R23. El estudio del transporte de ambos aminoácidos en la mutante MMY2/H3/LT1 *gap1let1let2*, deficiente en el transporte de leucina, permitió establecer si las mutaciones *let1let2* también afectan el transporte de isoleucina y valina.

IV. 1. Entrada e incorporación de L-¹⁴C-isoleucina y L-¹⁴C-valina

Para todas las cepas, el estudio del transporte de ambos aminoácidos de cadena ramificada se realizó en ausencia de fuentes de energía exógenas, en células crecidas en los medios MP, MA y YPD.

IV. 1. 1. Cepa normal MMY2

Las figuras IV. 1 y IV. 2 muestran las características de la incorporación de L-¹⁴C-isoleucina y L-¹⁴C-valina, respectivamente, en células de la cepa silvestre MMY2 crecidas en los diferentes medios de cultivo.

La incorporación de ambos aminoácidos aumenta linealmente con el tiempo de incubación, por lo menos, hasta los 6 minutos en los tres medios de cultivo y a las dos concentraciones externas ensayadas. Las excepciones corresponden a la concentración externa 0,05 mM para células crecidas en medio MP, donde se produce una rápida entrada de los aminoácidos hasta aproximadamente los 2 minutos, para luego permanecer casi constante.

La mayor incorporación de L-¹⁴C-isoleucina y L-¹⁴C-valina se produce en células crecidas con una fuente pobre de nitrógeno como L-prolina, donde la permeasa general de aminoácidos, GAP1, exhibe la máxima actividad.

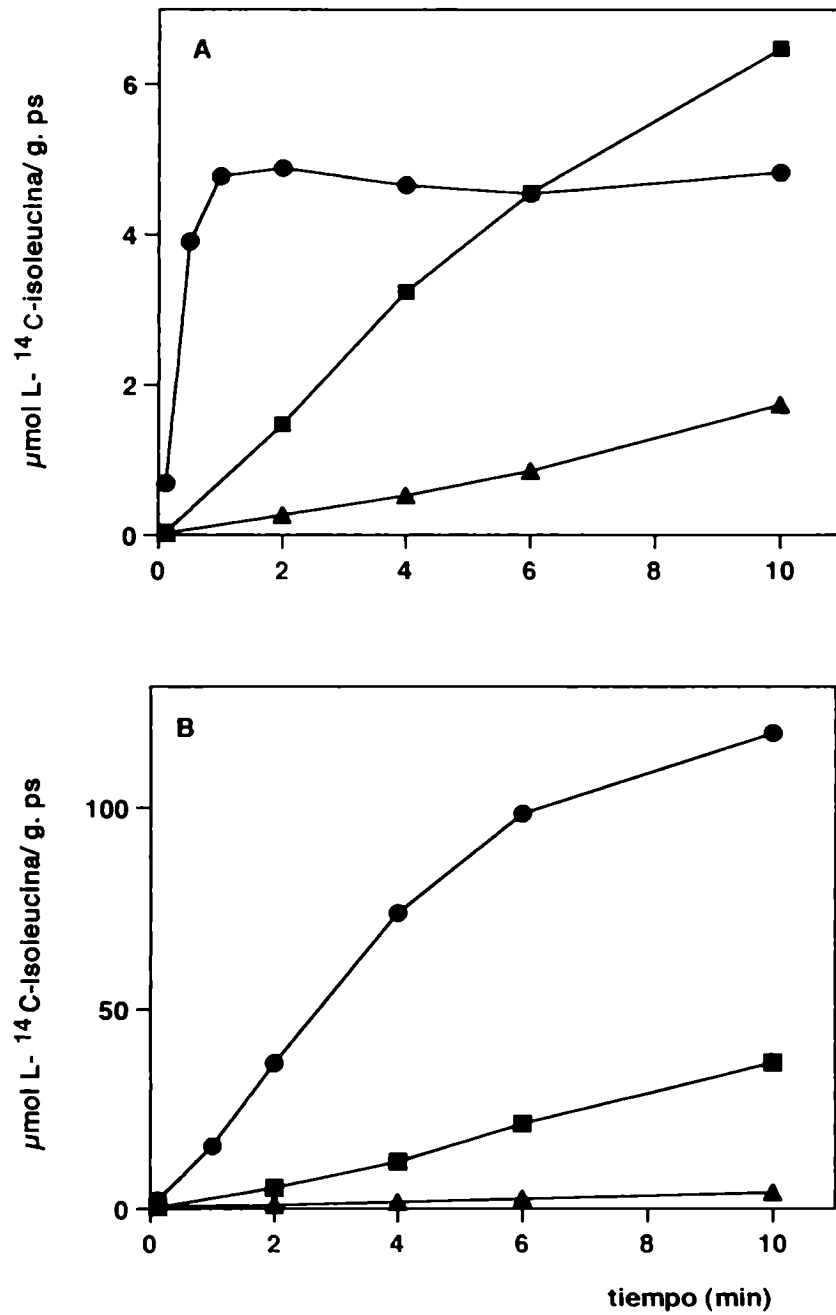


Figura IV.1. Incorporación de L-¹⁴C-isoleucina en células de la cepa MMY2 crecidas en los medios MP (●), MA (▲) y YPD (■). Las concentraciones de L-¹⁴C-isoleucina externa fueron 0,05 mM (A) y 1,0 mM (B).

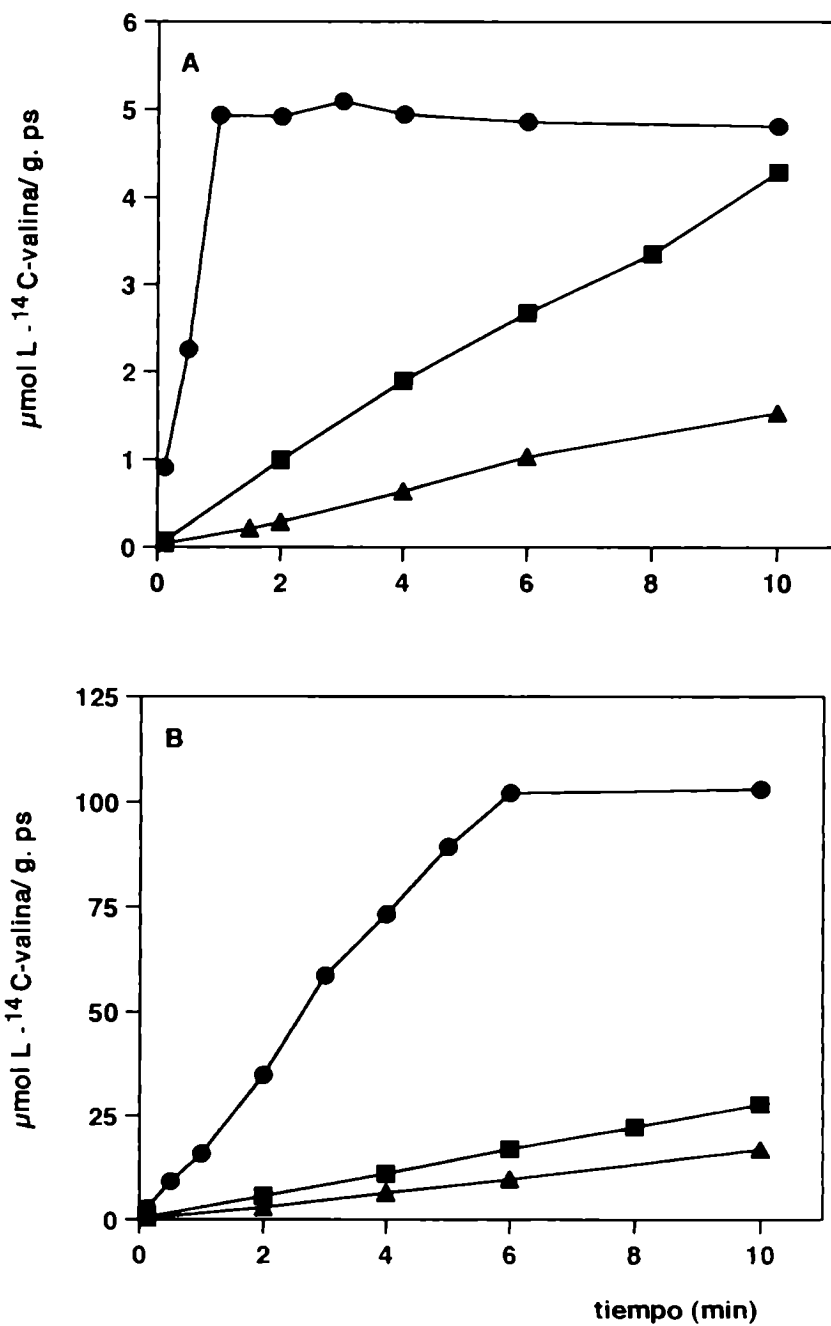


Figura IV.2. Incorporación de L-¹⁴C-valina en células de la cepa MMY2 crecidas en los medios MP (●), MA (▲) y YPD (■). Las concentraciones de L-valina externa fueron 0,05 mM (A) y 1,0 mM (B).

En cambio, el crecimiento de las células en presencia de iones amonio o de una fuente compleja de nitrógeno, condición donde la actividad de la GAP1 sufre un proceso de represión/inactivación, se produce una disminución considerable en los valores de captación de ambos aminoácidos a las dos concentraciones externas ensayadas. Sin embargo, en células crecidas en medio YPD, se obtuvieron mayores valores de incorporación de los aminoácidos con respecto a los obtenidos para el medio MA. Además, en medio YPD, a la concentración externa 0,05 mM de isoleucina y valina y a partir de los 6 minutos de incubación, la concentración de los aminoácidos acumulada es similar a la observada en el medio MP.

Al final de las incubaciones, las concentraciones milimolares intracelulares de L-¹⁴C-isoleucina fueron: 2,4 (0,05) y 53,2 (1,0) para el medio MP; 0,9 (0,05) y 2,0 (1,0) para el medio MA y 3,2 (0,05) y 18,3 (1,0) para el medio YPD. Las concentraciones milimolares intracelulares finales de L-¹⁴C-valina fueron: 2,4 (0,05) y 51,5 (1,0) para el medio MP; 0,8 (0,05) y 8,4 (1,0) para el medio MA y 2,1 (0,05) y 13,9 (1,0) para el medio YPD (entre paréntesis se indican las concentraciones externas de los L-¹⁴C-aminoácidos utilizadas). Las relaciones de concentración (intracelular-extracelular) alcanzadas al final de las incubaciones demuestran que el proceso de transporte de ambos aminoácidos es concentrativo.

En la Tabla IV. 1 se observa el efecto de la fuente de nitrógeno presente en el medio de cultivo sobre las velocidades iniciales (v_i) de transporte de L-¹⁴C-isoleucina y L-¹⁴C-valina en todas las condiciones ensayadas.

Tabla IV.1 : Efecto del medio de cultivo sobre la velocidad inicial de transporte de L-¹⁴C-isoleucina y L-¹⁴C-valina en la cepa silvestre MMY2

Medio de cultivo	Velocidad inicial (v_i)			
	L- ¹⁴ C-isoleucina		L- ¹⁴ C-valina	
	0,05 mM	1,0 mM	0,05 mM	1,0 mM
MP	6,45	18,70	4,60	18,78
MA	0,13	0,30	0,16	1,54
YPD	0,82	2,95	0,47	2,69

Las v_i ($\mu\text{mol min}^{-1}\text{g}^{-1}$) se calcularon a partir de los datos de las Figuras IV.1 y IV. 2.

Estos resultados muestran la importancia del transporte de isoleucina y valina por la GAP1 con alta velocidad en células crecidas en medio MP. El hecho de que el transporte de los dos aminoácidos es concentrativo, tanto en medio MA como en medio YPD, en condiciones de ausencia de actividad de GAP1, indica la presencia de otro/s sistema/s de transporte de isoleucina y valina que son más activos en medio YPD que en presencia de iones amonio.

IV. 1. 1. 1. Recuperación y análisis del ^{14}C acumulado

El primer paso en el estudio de un proceso de transporte mediado, a través de las membranas biológicas, consiste en asegurarse que la sustancia transportada existe en la misma forma molecular o iónica en ambos compartimientos. Por lo tanto, luego de incubar las células con L- ^{14}C -isoleucina o L- ^{14}C -valina durante 10 y 15 minutos, se procedió a la recuperación y análisis de la marca incorporada como se describió en Materiales y Métodos.

El ensayo se realizó en la cepa silvestre MMY2, en células crecidas en medio MP en el cual la permeasa general de aminoácidos, GAP1, alcanza su máxima actividad. Se utilizaron dos concentraciones externas de los L- ^{14}C -aminoácidos: baja concentración 0,05 mM, donde se esperaría que el aminoácido fuera utilizado para propósitos anabólicos (incorporación directa a proteínas) y alta concentración 1,0 mM, donde se esperaría que el aminoácido fuera utilizado para propósitos catabólicos.

A la concentración externa 0,05 mM y luego de 10 minutos de incubación, la marca total acumulada (que implica las fracciones solubles y no-solubles) de isoleucina y valina fue de 5,57 y 5,10 $\mu\text{mol g}^{-1}$ respectivamente, mientras que a los 15 minutos fue de 4,94 y 4,80 $\mu\text{mol g}^{-1}$ respectivamente, produciéndose entonces una pequeña pérdida de la marca con el aumento del tiempo de incubación y en forma concomitante, un aumento similar de la radiactividad en el sobrenadante luego de la separación de las células. En estas condiciones experimentales, sólo el 16% (10 min) y 21% (15 min) del ^{14}C acumulado se encuentra en la fracción insoluble en metanol/agua.

A la concentración externa 1,0 mM la marca total incorporada por las células aumentó con el tiempo de incubación, siendo de 111,78 y 143,55 $\mu\text{mol g}^{-1}$ a los 10 y 15 min respectivamente, para L- ^{14}C -isoleucina y de 100,40 y 133,64 $\mu\text{mol g}^{-1}$ a los 10 y 15 min respectivamente, para L- ^{14}C -valina. Estos valores se correlacionan con una

disminución proporcional de la marca presente en el sobrenadante luego de la separación de las células. La marca extraída presente en la fracción soluble también aumentó con el tiempo de incubación, siendo para L-¹⁴C-isoleucina de 104,32 (10 min) y 131,76 (15 min) $\mu\text{mol g}^{-1}$ y para L-¹⁴C-valina de 93,96 (10 min) y 124,41 (15 min) $\mu\text{mol g}^{-1}$ y solamente entre el 6-8% del ¹⁴C incorporado permanece en la fracción insoluble en metanol/agua.

Como la eficiencia de la extracción fue menor a la concentración externa 0,05 que a 1,0 mM del aminoácido, en proporción hay una mayor incorporación de los L-¹⁴C-aminoácidos a proteínas cuando se utilizan bajas concentraciones.

Los perfiles de los análisis cromatográficos de las fracciones solubles de L-¹⁴C-isoleucina y L-¹⁴C-valina se muestran en las Figuras IV. 3 y IV. 4, respectivamente. Todo el material radiactivo presente en las fracciones solubles para ambos aminoácidos, se resolvieron en un único pico con R_f idénticos al de los patrones.

IV. 1. 2. Cepas *gap1*: MMY2/H3 y KE3-R23

La cepa MMY2/H3 mutante *gap1*, isogénica a MMY2 excepto para la mutación mencionada, permite investigar el efecto de la fuente de nitrógeno del medio de cultivo sobre la actividad residual de transporte de L-isoleucina y L-valina, como se muestra en las Figuras IV. 5 y IV. 6, respectivamente. Por otra parte, fue posible conocer la contribución de la GAP1 en la actividad total de transporte de ambos aminoácidos en células crecidas en medio MP.

Los valores de incorporación de ambos aminoácidos radiactivos, aumentan linealmente con el tiempo de incubación en los tres medios de cultivo y a las dos concentraciones externas ensayadas.

En la cepa MMY2/H3, las concentraciones milimolares intracelulares de L-¹⁴C-isoleucina a los 10 minutos fueron las siguientes 2,5 (0,05) y 15,9 (1,0) para el medio MP; 0,9 (0,05) y 2,1 (1,0) para el medio MA y 3,4 (0,05) y 20,5 (1,0) para el medio YPD. Las concentraciones milimolares intracelulares finales de L-¹⁴C-valina fueron : 2,1 (0,05) y 14,0 (1,0) para el medio MP; 1,4 (0,05) y 11,0 (1,0) para el medio MA y 2,3 (0,05) y 14,8 (1,0) para el medio YPD (entre paréntesis se indican las concentraciones externas de los L-¹⁴C-aminoácidos utilizadas). En todos los casos, el proceso de incorporación de los aminoácidos fue concentrativo.

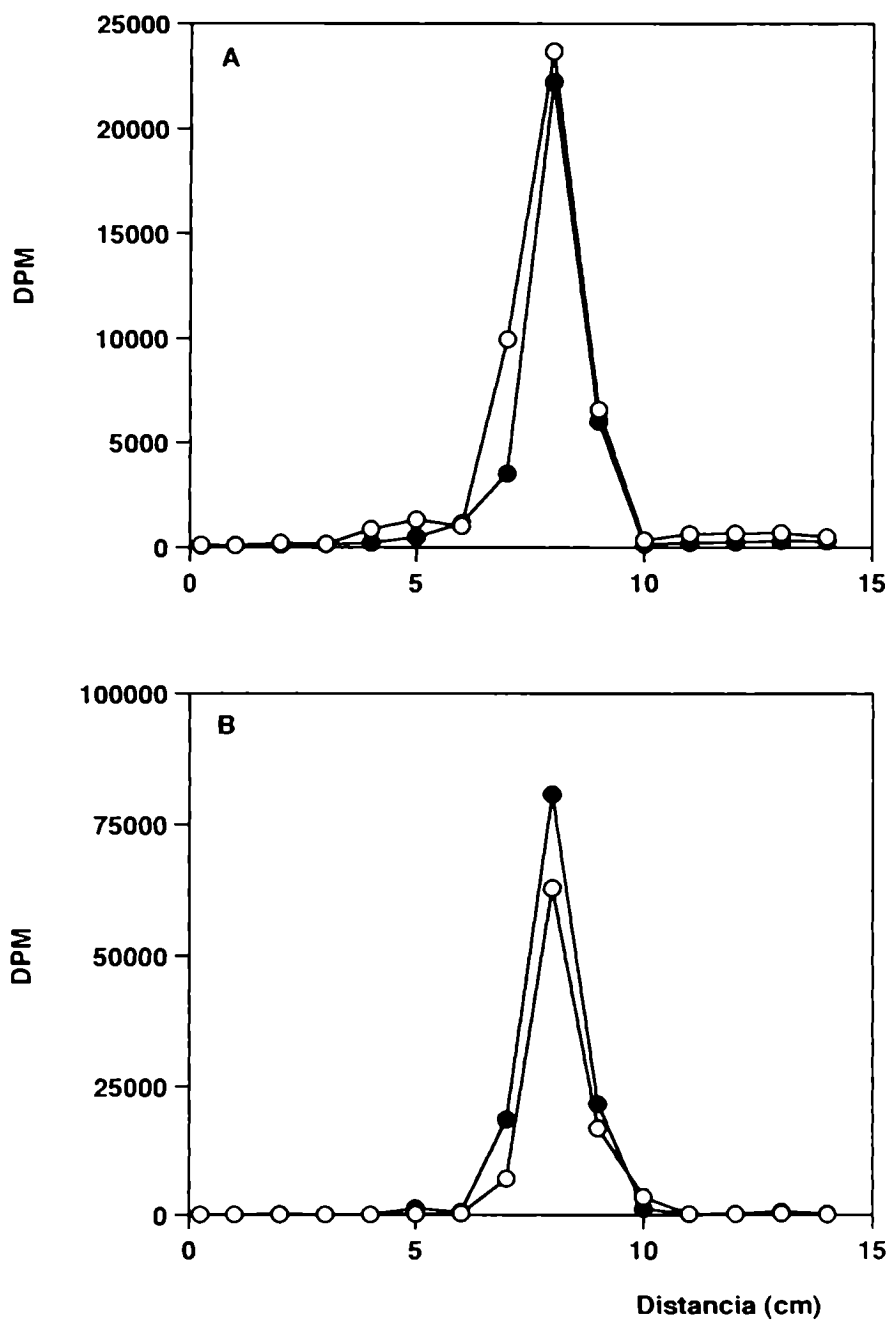


Figura IV. 3. Recuperación y análisis de L-¹⁴C-isoleucina acumulada en células de la cepa MMY2.

Las células fueron crecidas en medio MP e incubadas con 0,05 mM (A) y 1,0 mM (B) de L-¹⁴C-isoleucina durante 10 (o) y 15 (●) minutos.

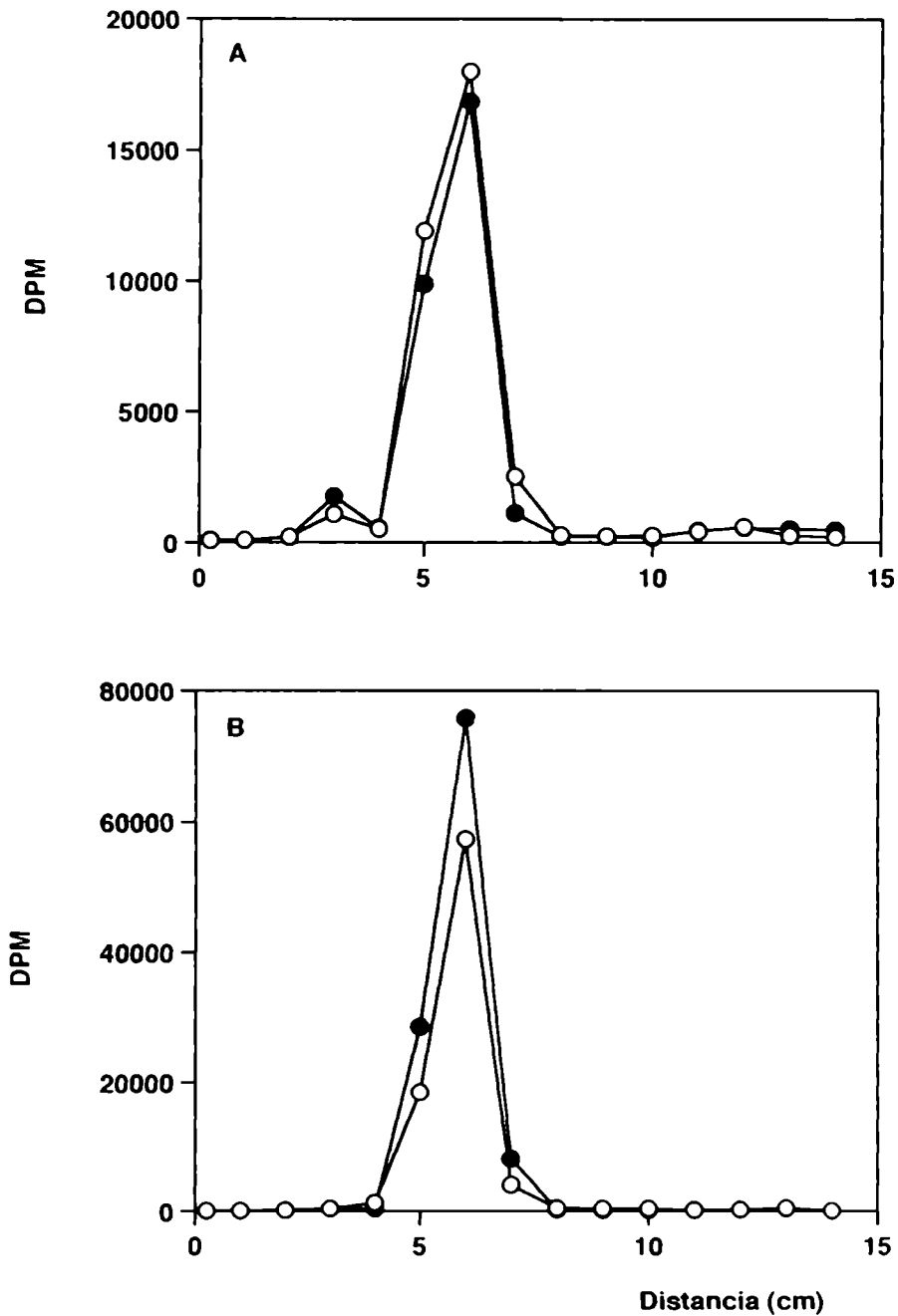


Figura IV. 4. Recuperación y análisis de L-¹⁴C-valina acumulada en células de la cepa MMY2.

Las células fueron crecidas en medio MP e incubadas con 0,05 mM (A) y 1,0 mM (B) de L-¹⁴C-valina durante 10 (o) y 15 (●) minutos.

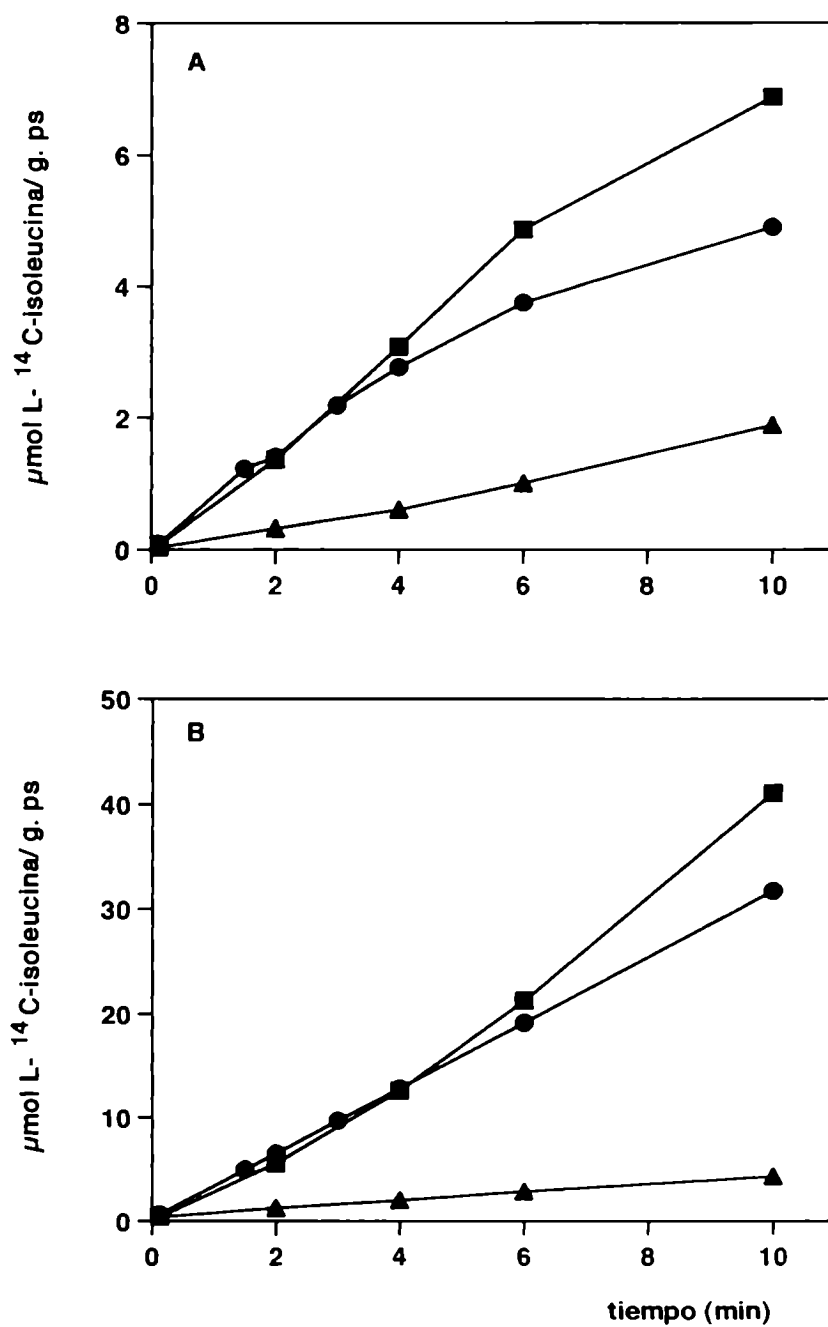


Figura IV. 5. Incorporación de L-¹⁴C-isoleucina en células de la cepa MMY2/H3 crecidas en los medios MP (●), MA (▲) y YPD (■). Las concentraciones de L-isoleucina externa fueron 0,05 mM (A) y 1,0 mM (B).

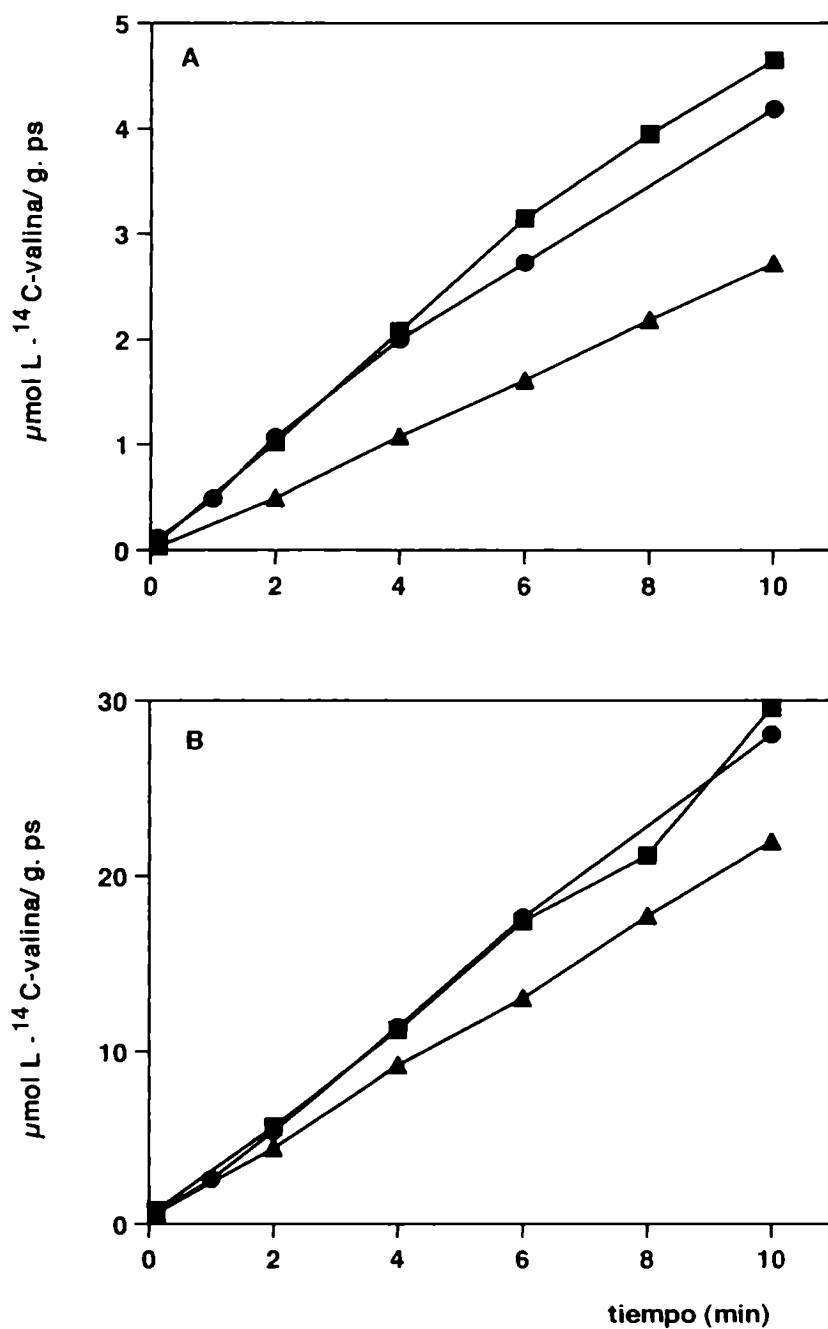


Figura IV. 6. Incorporación de L-¹⁴C-valina en células de la cepa MMY2/H3 crecidas en los medios MP (●), MA (▲) y YPD (■). Las concentraciones de L-valina externa fueron 0,05 mM (A) y 1,0 mM (B).

Las Figuras IV. 7 y IV. 8 muestran las características de la incorporación de L-¹⁴C- isoleucina y L-¹⁴C-valina en la cepa KE3-R23, también mutante *gap1*. En las Tablas IV. 2 y IV. 3 se presentan los valores de velocidades iniciales del transporte de isoleucina y valina respectivamente, en ambas cepas, en las diferentes condiciones experimentales.

Tabla IV. 2. Efecto del medio de cultivo sobre la velocidad inicial de transporte de L-¹⁴C-isoleucina en las cepas mutantes *gap1*.

Medio de cultivo	v_i de transporte de L- ¹⁴ C-isoleucina			
	0,05 mM		1,0 mM	
	MMY2/H3	KE3-R23	MMY2/H3	KE3-R23
MP	0,71	0,51	3,14	2,15
MA	0,15	0,11	0,42	0,35
YPD	0,78	0,28	3,16	1,15

Las v_i ($\mu\text{mol min}^{-1} \text{g}^{-1}$) se calcularon a partir de los datos de las Figuras IV. 5 y IV. 7.

Tabla IV. 3. Efecto del medio de cultivo sobre la velocidad inicial de transporte de L-¹⁴C-valina en las cepas mutantes *gap1*.

Medio de cultivo	v_i de transporte de L- ¹⁴ C-valina			
	0,05 mM		1,0 mM	
	MMY2/H3	KE3-R23	MMY2/H3	KE3-R23
MP	0,49	0,24	2,81	1,38
MA	0,27	0,10	2,22	0,84
YPD	0,51	0,26	2,69	1,41

Las v_i ($\mu\text{mol min}^{-1} \text{g}^{-1}$) se calcularon a partir de los datos de las Figuras IV.7 y IV. 8.

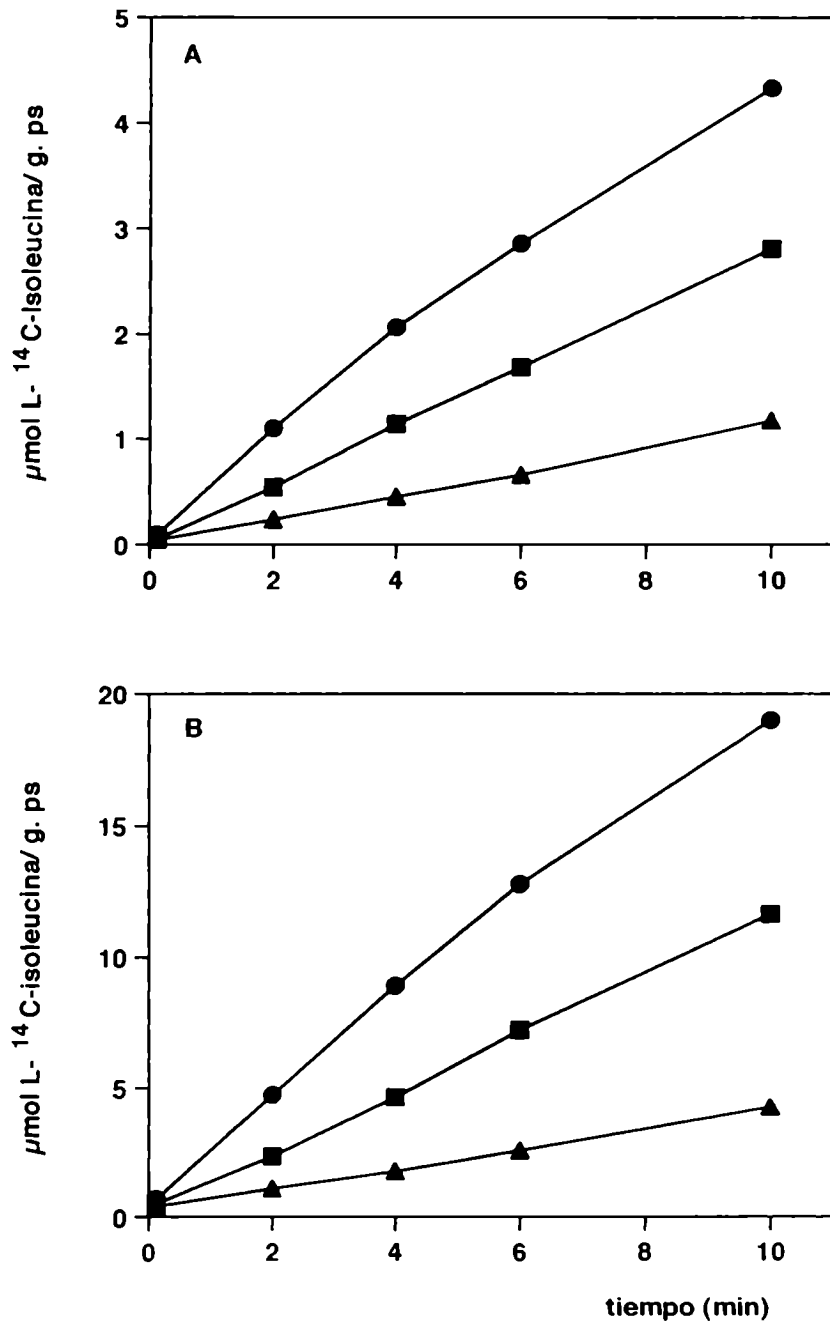


Figura IV. 7. Incorporación de L-¹⁴C-isoleucina en células de la cepa KE3-R23 crecidas en los medios MP (●), MA (▲) y YPD (■). Las concentraciones de L-isoleucina externa fueron 0,05 mM (A) y 1,0 mM (B).

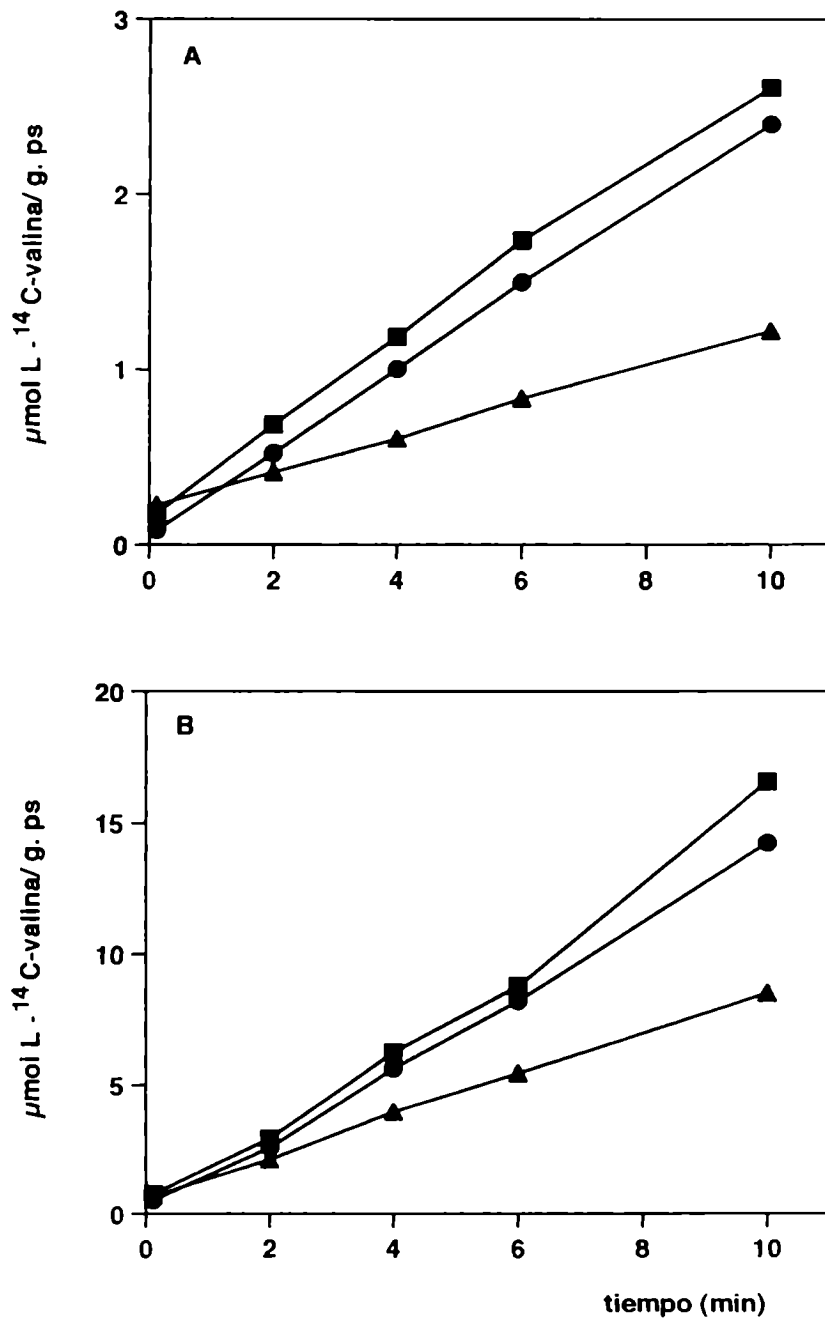


Figura IV. 8. Incorporación de L-¹⁴C-valina en células de la cepa KE3-R23 crecidas en los medios MP (●), MA (▲) y YPD (■). Las concentraciones de L-valina externa fueron 0,05 mM (A) y 1,0 mM (B).

Para ambos aminoácidos se obtuvieron similares valores de incorporación y de velocidades iniciales en células crecidas en los medios YPD y MP (Figuras IV. 5 - IV. 8 y Tablas IV. 2 y IV. 3) y mayores a los observados en células crecidas en medio MA, siendo esta diferencia más importante para el transporte de L-¹⁴C-isoleucina. Estos resultados indican que en la cepa MMY2/H3 *gap1*, la actividad remanente de transporte de L-isoleucina es sensible a la presencia de iones amonio en el medio de cultivo, con una disminución entre 5 y 7,5 veces para las concentraciones externas 0,05 y 1,0 mM, respectivamente, en relación a los valores obtenidos para células crecidas en los medios YPD o MP. Resultados similares se obtuvieron en la mutante KER-R23 *gap1*.

En esta mutante, Kotliar y col. (1994), describieron el mismo tipo de regulación para el transporte de L-leucina. En el caso del transporte de L-¹⁴C-valina, éste es poco afectado por la calidad de la fuente de nitrógeno presente en el medio de cultivo.

Por otra parte, si se comparan los trazados de las Figuras IV.1 y IV. 2 con los de las Figuras IV. 5 y IV. 6 ó los valores de v_i de la Tabla IV.1 con los de las Tablas IV. 2 y IV. 3 de las cepa normal MMY2 y de la mutante MMY2/H3 *gap1*, respectivamente, en cada medio, se observan valores similares de incorporación o de v_i en células crecidas en los medios YPD y MA, indicando, por lo tanto, que en estas condiciones de crecimiento no hay actividad de la permeasa general de aminoácidos en la cepa silvestre MMY2. La inactivación de la GAP1 por mutación en la cepa MMY2/H3, lleva a una muy considerable disminución de la capacidad de transporte de isoleucina y valina, en células crecidas en presencia de prolina como fuente de nitrógeno y que representa solamente entre el 10-15% del transporte total de cada uno de los aminoácidos, siendo la diferencia, lo que corresponde al transporte por la permeasa general de aminoácidos. Esta situación lleva a un cambio en el perfil de la incorporación de los aminoácidos a la concentración externa 0,05 mM en la cepa MMY2/H3.

IV. 1. 3. Cepa MMY2/H3/LT1 *gap1 let1 let2*

Como se comentó en el capítulo anterior, la cepa MMY2/H3/LT1 presenta un reducido transporte de L-leucina, como consecuencia de las mutaciones *let1let2* y prácticamente, no crece cuando L-leucina, L-isoleucina y L-valina son las únicas fuentes de nitrógeno presentes en el medio de cultivo. Por lo tanto, para indagar si las mutaciones *let* también afectan el transporte de L-isoleucina y L-valina, se estudió su

transporte en células de la cepa mutante MMY/H3/LT1 crecidas en las tres condiciones de cultivo (Figuras IV. 9 y IV. 10 y Tabla IV. 4).

Tabla IV. 4. Efecto del medio de cultivo sobre la velocidad inicial de transporte de L-¹⁴C-isoleucina y L-¹⁴C-valina en la cepa MMY2/H3/LT1 *gap1let1let2*.

Medio de cultivo	Velocidad inicial (v_i)			
	L- ¹⁴ C-isoleucina		L- ¹⁴ C-valina	
	0,05 mM	1,0 mM	0,05 mM	1,0 mM
MP	0,09	0,44	0,06	0,31
MA	0,02	0,14	0,03	0,25
YPD	0,07	0,26	0,04	0,32

Las v_i ($\mu\text{mol min}^{-1}\text{g}^{-1}$) se calcularon a partir de los datos de las Figuras IV. 9 y IV. 10.

En todos los casos, los valores de incorporación de cada uno de los aminoácidos aumentaron linealmente con el tiempo de incubación.

Las concentraciones milimolares de isoleucina acumulada durante 10 min fueron: 0,4 (0,05) y 1,9 (1,0) para el medio MP; 0,1 (0,05) y 0,6 (1,0) para el medio MA y 0,4 (0,05) y 1,4 (1,0) para el medio YPD. Las concentraciones milimolares intracelulares finales de L-¹⁴C-valina fueron: 0,27 (0,05) y 1,55 (1,0) para el medio MP; 0,20 (0,05) y 1,84 (1,0) para el medio MA y 0,27 (0,05) y 2,38 (1,0) para el medio YPD (entre paréntesis se indican las concentraciones externas de los L-¹⁴C-aminoácidos utilizadas).

El proceso de transporte de isoleucina y valina sigue siendo concentrativo, sobre todo a bajas concentraciones externas de los mismos y para células crecidas en medio MA, en cambio, el transporte de isoleucina es facilitado o debido a difusión a las concentraciones externas mayores. Los valores de acumulación de L-valina, así como los valores de velocidades iniciales de su transporte, son similares en células provenientes de los tres medios de cultivo, en cambio, el transporte de L-isoleucina fue menor en células crecidas en medio MA comparado con el observado en células crecidas en los medios YPD o MP.

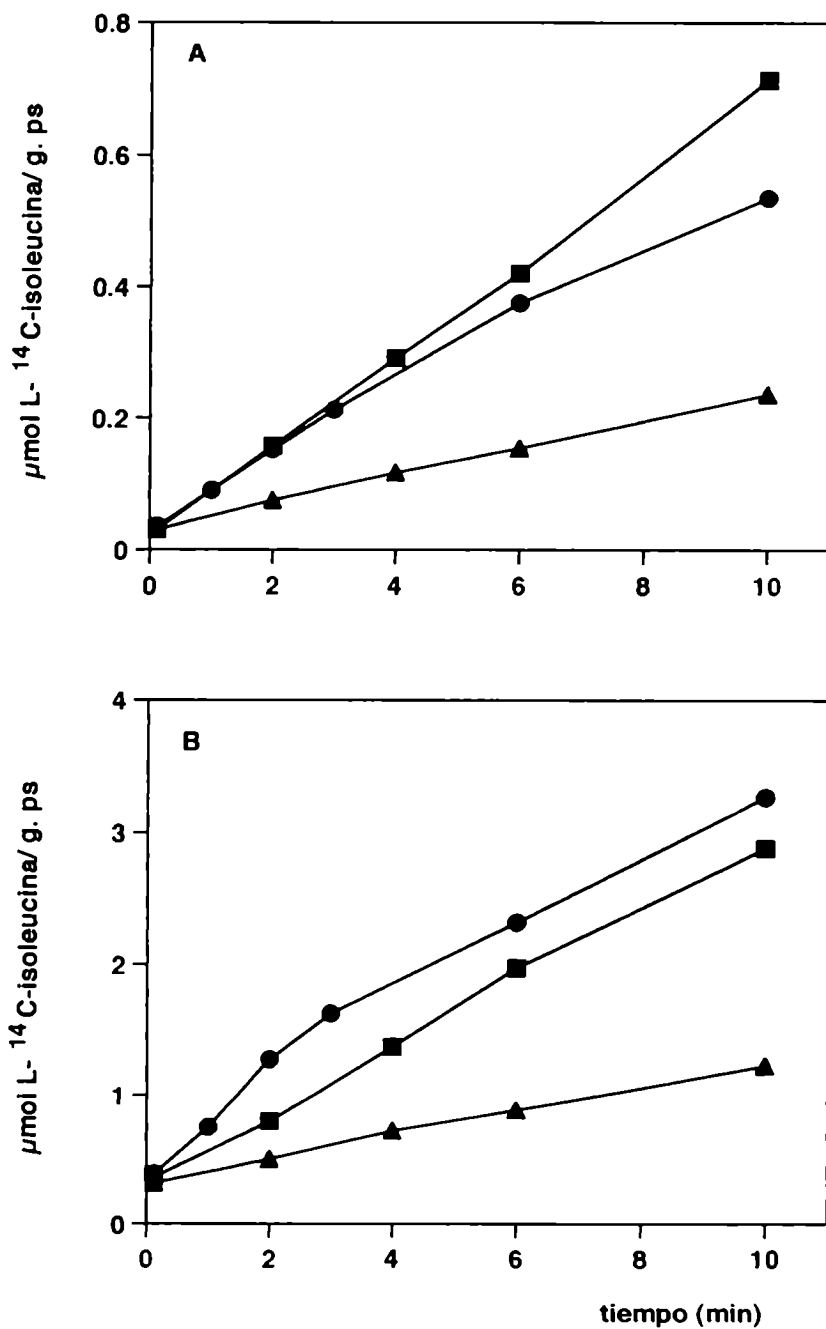


Figura IV. 9. Incorporación de L-¹⁴C-isoleucina en células de la cepa MMY2/H3/LT1 crecidas en los medios MP (●), MA (▲) y YPD (■). Las concentraciones de L-isoleucina externa fueron 0,05 mM (A) y 1,0 mM (B).

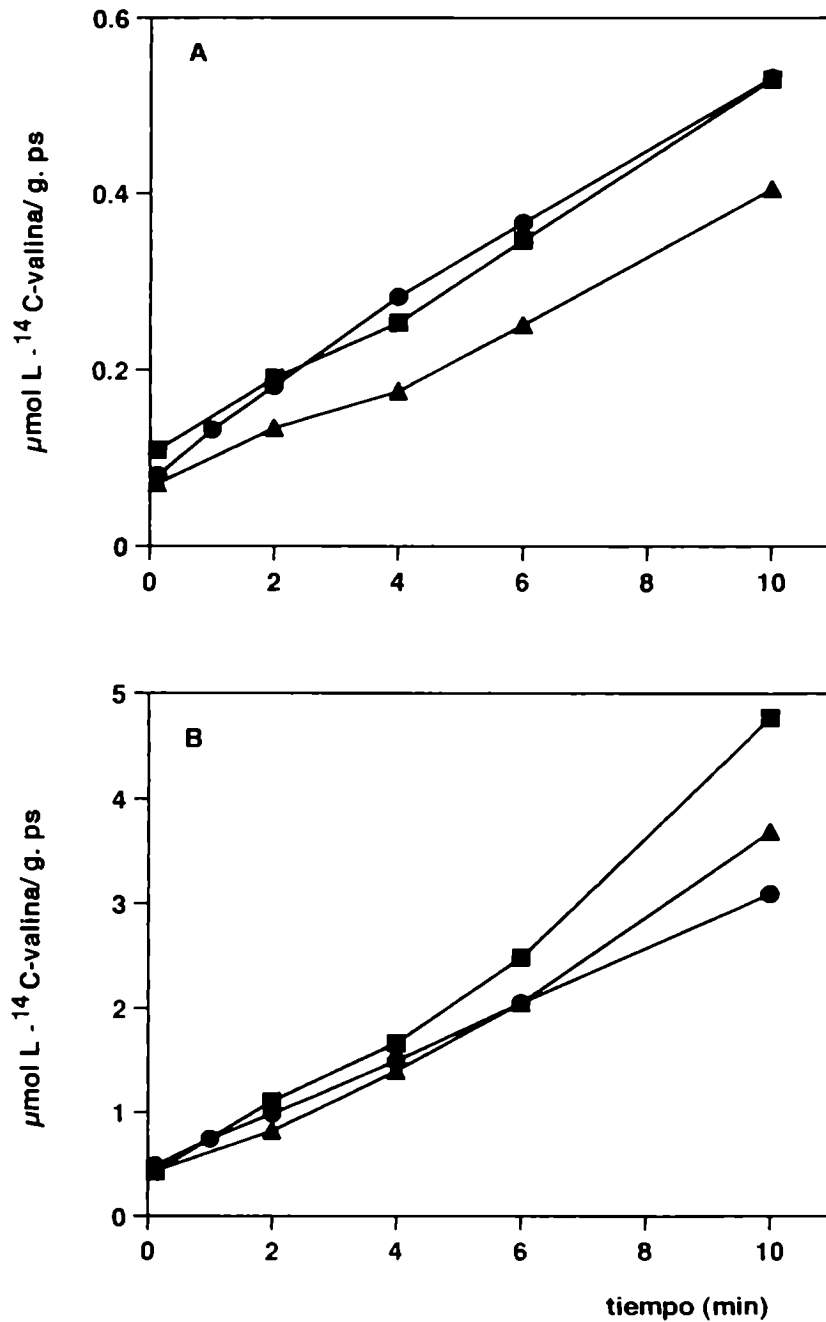


Figura IV. 10. Incorporación de L-¹⁴C-valina en células de la cepa MMY2/H3/LT1 crecidas en los medios MP (●), MA (▲) y YPD (■). Las concentraciones de L-valina externa fueron 0,05 mM (A) y 1,0 mM (B).

En la cepa MMY2/H3/LT1, la actividad de transporte, tanto de L-isoleucina como la de L-valina, se redujo entre 4-13 veces comparada con la observada en la cepa MMY2/H3 *gap1*, dependiendo esa reducción, del aminoácido, de la concentración externa del mismo y del medio de cultivo.

Por consiguiente, las mutaciones *let1/let2* presentes en la cepa MMY2/H3/LT1 que reducen el transporte de leucina, también afectaron en forma muy significativa el transporte de isoleucina y valina.

IV. 1. 4. Cepa MMY2/LT1/GAP1 *let1 let2*

A partir de la cepa MMY2/H3/LT1, crecida en presencia de L-citrulina (1mM) como única fuente de nitrógeno, un aminoácido que es transportado exclusivamente por la GAP1 (Grenson y col., 1970), fue aislada la revertante MMY2/LT1/GAP1 como se describió en Materiales y Métodos. La presencia de actividad de la permeasa general de aminoácidos fue confirmada por el ensayo de incorporación de L-¹⁴C-citrulina 0,05 mM. En células crecidas en los medios MA y MP, las velocidades iniciales de transporte de L¹⁴C-citrulina fueron 0,08 y 2,19 $\mu\text{mol min}^{-1} \text{g}^{-1}$ respectivamente, mientras que para la cepa normal MMY2 fueron 0,03 y 2,64 $\mu\text{mol min}^{-1} \text{g}^{-1}$

Por lo tanto, en la cepa MMY2/LT1/GAP1 puede estudiarse el transporte de isoleucina y valina mediado casi exclusivamente por la GAP1 en el medio MP y la regulación de dicha permeasa en los medios MA e YPD (Figuras IV. 11 y IV. 12 y Tabla IV. 5).

Tabla IV. 5. Efecto del medio de cultivo sobre la velocidad inicial de transporte de L-¹⁴C-isoleucina y L-¹⁴C-valina en la cepa MMY2/LT1/GAP1 *let1/let2*.

Medio de cultivo	<i>v_i</i> de transporte de			
	L- ¹⁴ C-isoleucina		L- ¹⁴ C-valina	
	0,05 mM	1,0 mM	0,05 mM	1,0 mM
MP	5,62	13,34	4,07	13,34
MA	0,33	0,64	0,11	0,76
YPD	0,07	0,29	0,05	0,39

Las *v_i* ($\mu\text{mol min}^{-1} \text{g}^{-1}$) se calcularon a partir de los datos de las Figuras IV. 11 y IV. 12.

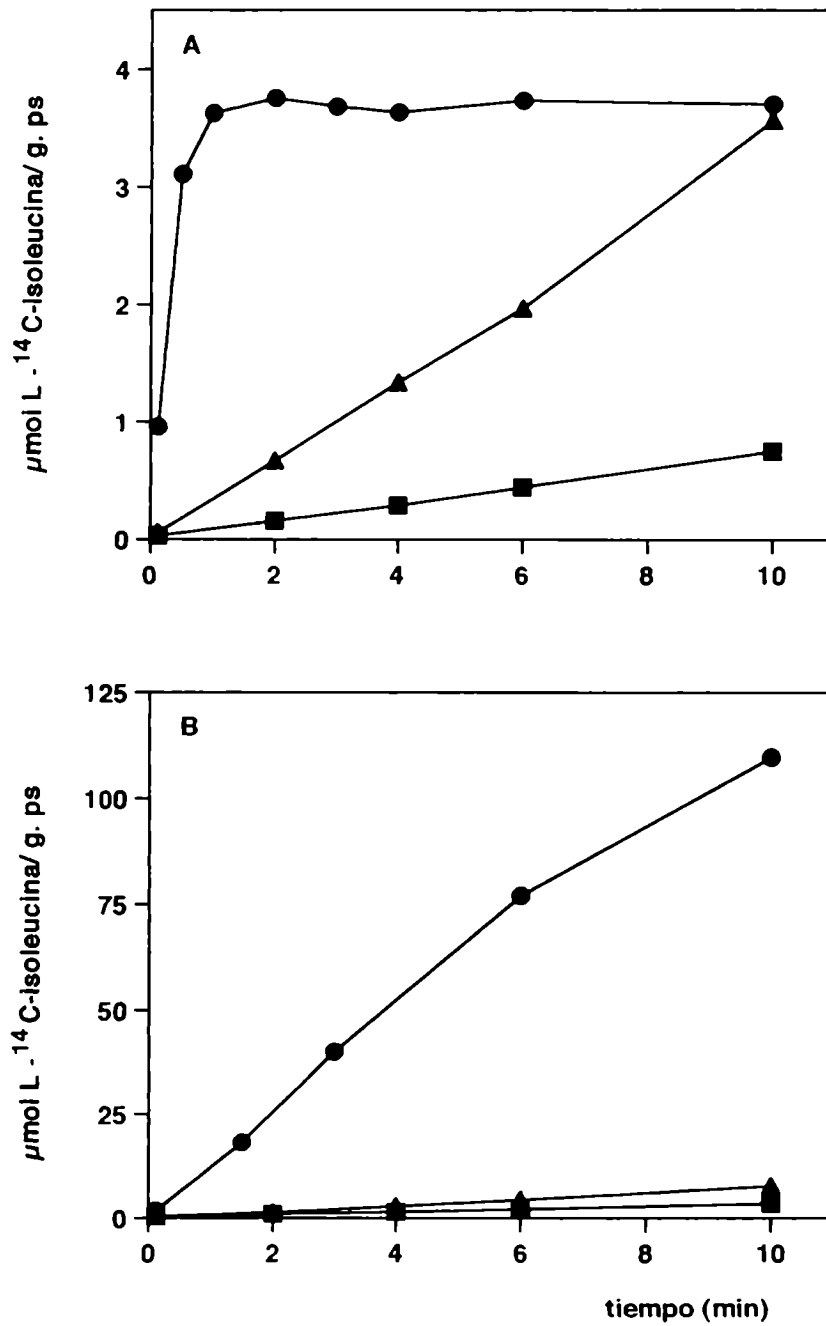


Figura IV. 11. Incorporación de L-¹⁴C-isoleucina en células de la cepa MMY2/LT1/GAP1 crecidas en los medios MP (●), MA (▲) y YPD (■). Las concentraciones de L- isoleucina externa fueron 0,05 mM (A) y 1,0 mM (B).

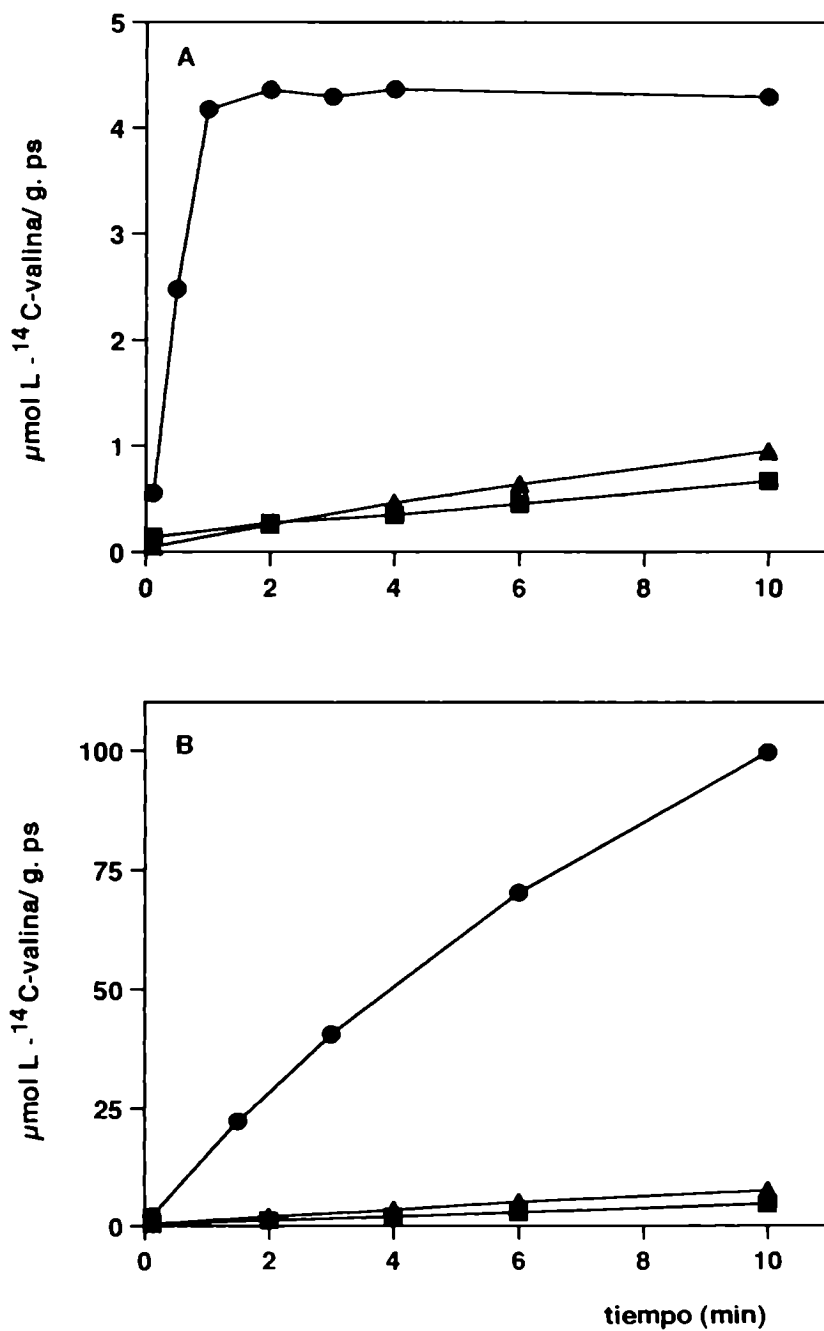


Figura IV. 12. Incorporación de L-¹⁴C-valina en células de la cepa MMY2/LT1/GAP1 crecidas en los medios MP (●), MA (▲) y YPD (■). Las concentraciones de L- isoleucina externa fueron 0,05 mM (A) y 1,0 mM (B).

En cambio, si las células son crecidas en presencia de una fuente compleja de nitrógeno, se obtienen resultados casi idénticos a los de la cepa MMY2/H3/LT1, tanto en los trazados de incorporación como en las velocidades iniciales de transporte de isoleucina y valina (Tablas IV. 4 y IV. 5), indicando la inactivación de la permeasa general de aminoácidos.

En medio MA, la actividad de transporte de isoleucina y valina es limitada pero mayor a la obtenida en la cepa MMY2/H3/LT1, lo que indicaría una reducida actividad de GAP1, posiblemente para compensar la deficiencia en el/los sistema/s de transporte más específicos de isoleucina y valina afectados por las mutaciones *let*.

IV. 2. Análisis cinético del transporte de L-isoleucina y L-valina

Se determinaron los parámetros cinéticos del transporte de isoleucina y valina en la cepa silvestre MMY2 y en las mutantes derivadas de la misma. Se eligió el medio mínimo con prolina como fuente de nitrógeno para el crecimiento de las células, condiciones en que la mayoría de las cepas desarrollan la máxima actividad de transporte de los aminoácidos. En la mayor parte de los experimentos, el rango de concentraciones externas utilizadas de los L-¹⁴C-aminoácidos fue de 0,02-2,0 mM.

IV. 2. 1. Parámetros cinéticos del transporte de L-isoleucina

En cada una de las cepas estudiadas, la representación de las velocidades iniciales de transporte de L-¹⁴C-isoleucina en función de su concentración externa, produjeron curvas hiperbólicas y los gráficos de dobles recíprocas fueron lineales (Figuras IV. 13 y IV. 14). En la Tabla IV. 6 se presentan los parámetros cinéticos obtenidos a partir de las representaciones de Lineweaver-Burk de las figuras anteriores.

Por lo tanto, en estas condiciones experimentales, se puede caracterizar cinéticamente un único sistema de transporte de L-isoleucina con diferentes valores de K_T y $J_{m\acute{a}x}$.

En la cepa silvestre MMY2, la alta capacidad de transporte de la permeasa general de aminoácidos, GAP1, enmascara la presencia de al menos otro sistema más específico de transporte de isoleucina, que puede ser detectado en las cepas mutantes *gap1* MMY2/H3 y KE3-R23 (Figuras IV. 13 y IV. 14, Tabla IV. 6).

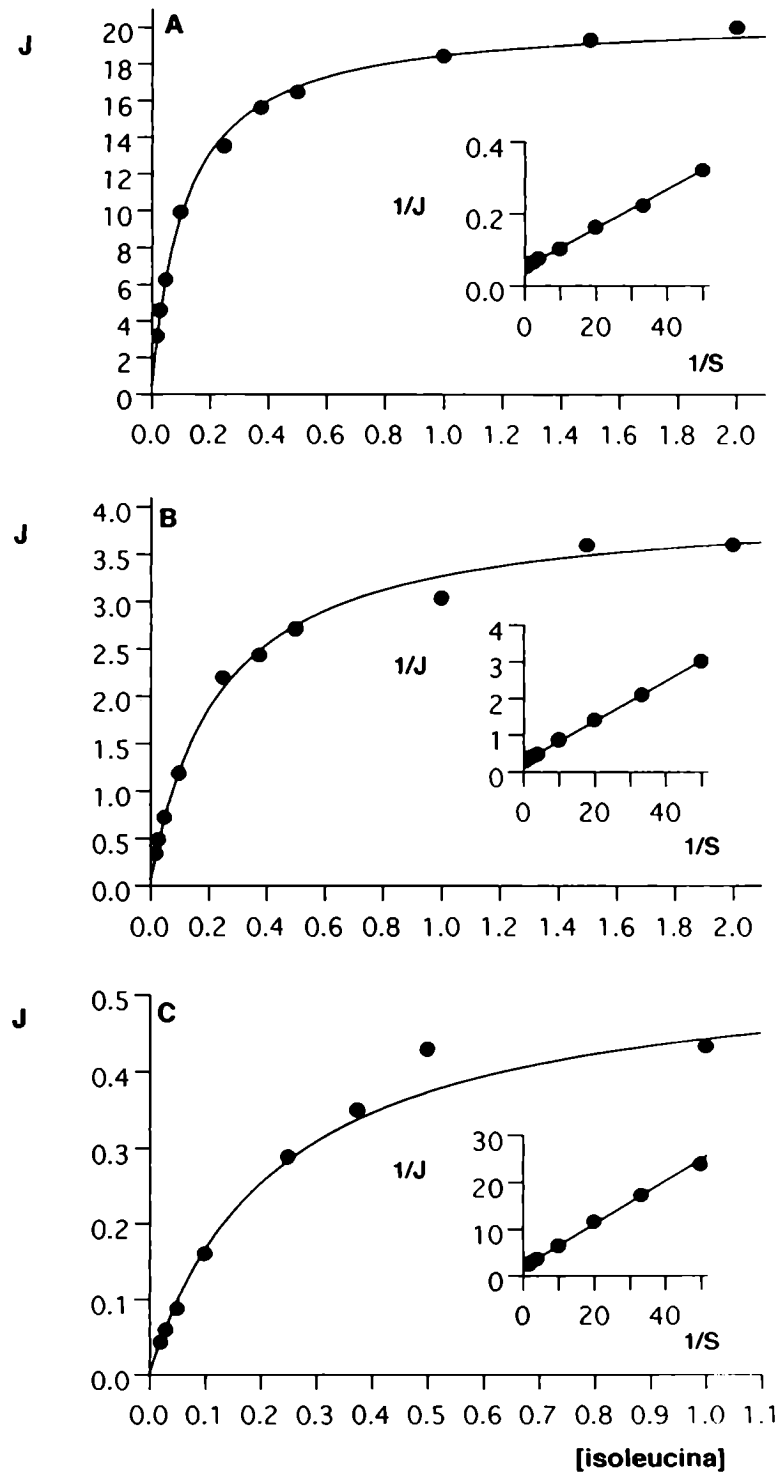


Figura IV. 13. Cinética de transporte de L-isoleucina en células de las cepas MMY2(A), MMY2/H3 (B) y MMY2/H3/LT1 (C), crecidas en medio MP.

Inset: Representación de Lineweaver-Burk.

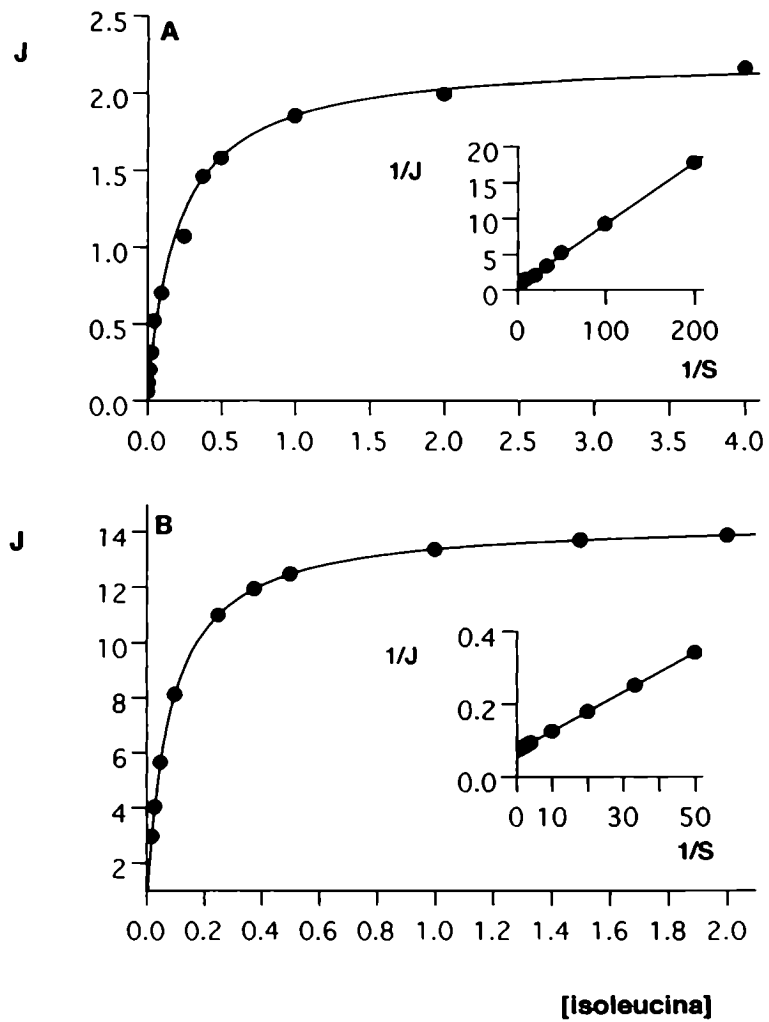


Figura IV. 14. Cinética de transporte de L-isoleucina en células de las cepas KE3-R23 (A) y MMY2/LT1/GAP1 (B) crecidas en medio MP.

Inset: Representación de Lineweaver-Burk.

Tabla IV. 6: Parámetros cinéticos del transporte de L-isoleucina

Cepa	K_T (μM)	$J_{\text{máx}}$ ($\mu\text{mol min}^{-1} \text{g}^{-1}$)
MMY2	108	20,38
MMY2/H3	209	3,81
KE3-R23	181	2,32
MMY2/H3/LT1	249	0,56
MMY2/LT1/GAP	78	14,42

Los valores de los parámetros cinéticos se calcularon a partir de las representaciones de los inset de las Figuras IV. 13 y IV. 14.

La presencia de dos sistemas separados de transporte de un aminoácido, puede ser detectada si los valores de K_T difieren en por lo menos un orden de magnitud, y si el sistema de alta afinidad tiene una capacidad más baja que el sistema de menor afinidad. Sistemas que no posean estas características pueden ser enmascarados por el o los otros sistemas presentes.

En la cepa MMY2/H3/LT1 *gap1let1let2*, el transporte de isoleucina se efectúa con una afinidad del orden al del sistema presente en la cepa parental MMY2/H3, pero con muy baja capacidad (Figura IV. 13C).

Estos resultados son similares a los obtenidos para el transporte de leucina por el sistema S2, sugiriendo que la mutación *let2* también afectó el transporte de isoleucina.

Las características cinéticas de la permeasa general de aminoácidos se estudiaron en la cepa MMY2/LT1/GAP (Figura IV. 14B), donde el transporte de isoleucina por el sistema más específico es insignificante. Los valores de K_T y $J_{\text{máx}}$ obtenidos indican que el transporte de isoleucina, mediado por la GAP1, es alta afinidad y alta capacidad.

IV. 2. 2. Parámetros cinéticos del transporte de L-valina

En cada una de las cepas estudiadas, la representación de las velocidades iniciales de transporte de L-¹⁴C-valina en función de su concentración externa, produjeron curvas hiperbólicas y los gráficos de dobles recíprocas fueron lineales (Figuras IV. 15 y IV. 16).

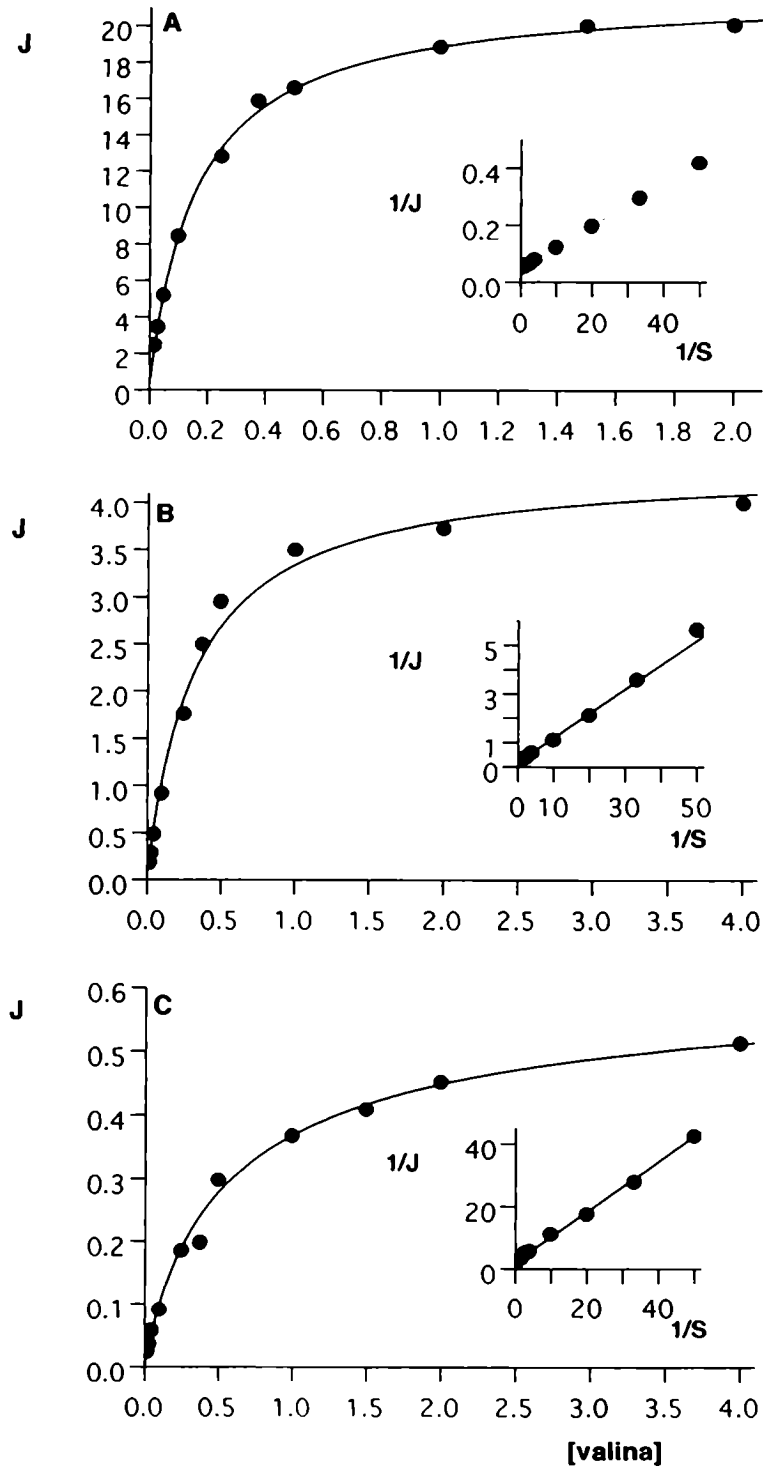


Figura IV. 15. Cinética de transporte de L-valina en células de las cepas MMY2(A), MMY2/H3 (B) y MMY2/H3/LT1 (C), crecidas en medio MP.

Inset: Representación de Lineweaver-Burk.

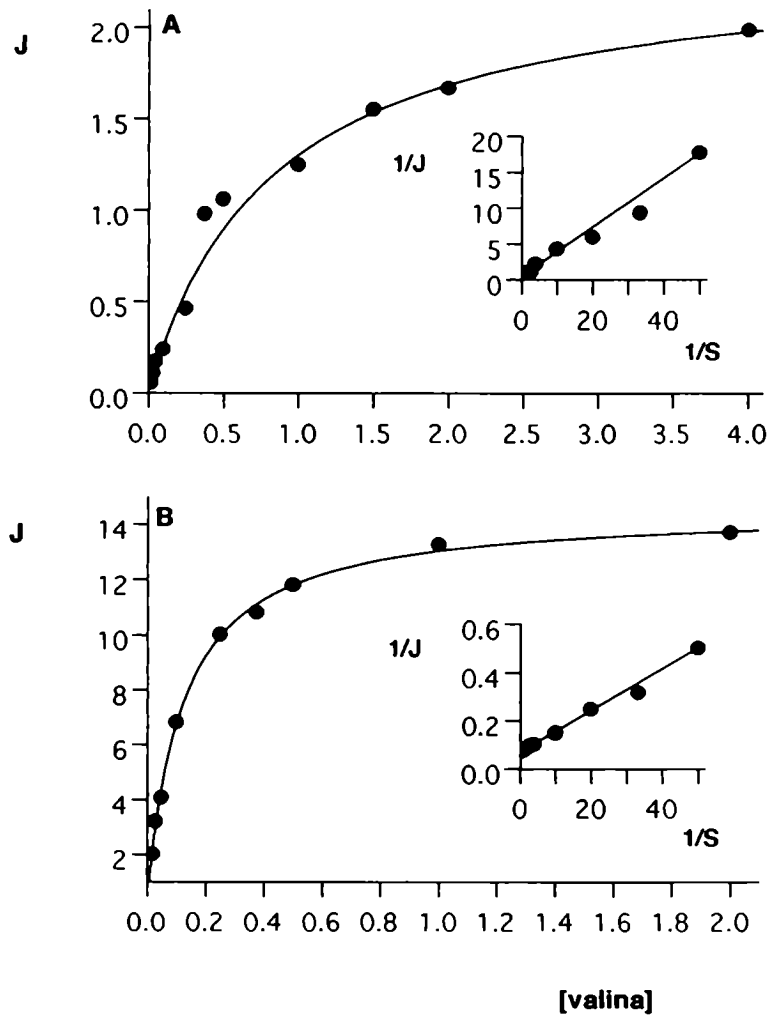


Figura IV. 16. Cinética de transporte de L-valina en células de las cepas KE3-R23 (A) y MMY2/LT1/GAP1 (B) crecidas en medio MP.

Inset: Representación de Lineweaver-Burk.

En la Tabla IV. 7 se presentan los parámetros cinéticos obtenidos a partir de las representaciones de Lineweaver-Burk de las figuras anteriores.

Tabla IV. 7. Parámetros cinéticos del transporte de L-valina

Cepas	K_T (μM)	$J_{\text{máx}}$ ($\mu\text{mol min}^{-1} \text{g}^{-1}$)
MMY2	162	21,62
MMY2/H3	420	4,71
KE3-R23	375	2,17
MMY2/H3/LT1	383	0,46
MMY2/LT1/GAP	124	14,90

Los valores de los parámetros cinéticos se calcularon a partir de las representaciones de las Figuras IV. 15 y IV. 16.

Si bien en la cepa silvestre MMY2, se caracterizó cinéticamente sólo un sistema de transporte de L-valina de alta afinidad y alta velocidad, en las cepas mutantes *gap1* se pone de manifiesto la presencia de al menos otra permeasa de baja afinidad ($K_T = 0,42 \text{ mM}$) más específica, transportando el aminoácido (Figuras IV. 15 y IV. 16, Tabla IV. 7).

En la triple mutante MMY2/H3/LT1 el valor de K_T es similar a los obtenidos para las mutantes *gap1* mientras que el valor de $J_{\text{máx}}$ está reducido 10 veces con respecto al de su cepa parental MMY2/H3, corroborando lo observado en los ensayos de incorporación (Figura IV. 15C y Tabla IV. 7)

Los resultados en esta cepa para el transporte de valina, son similares a los encontrados para el transporte de leucina e isoleucina, por consiguiente, la mutación *let2* sería responsable de la reducción en la capacidad de transporte de los aminoácidos de cadena ramificada.

Por otra parte, en la cepa revertante MMY2/LT1/GAP1 puede ser caracterizado el transporte de L-valina mediado por el sistema GAP1 (Figura IV. 16B), siendo éste de alta afinidad y alta capacidad (Tabla IV. 7).

IV. 3. Conclusiones

En este capítulo se describe la caracterización del transporte de L-isoleucina y L-valina en la cepa silvestre MMY2 y en las mutantes *gap1*, *gap1let1let2* y *let1let2*, isogénicas de MMY2, excepto para las mutaciones mencionadas. Se determinó que:

- en células de la cepa MMY2 crecida en medio MP, la permeasa general de aminoácidos, GAP1, contribuye en un 80-85% en la actividad total de transporte de L-isoleucina y L-valina;

- por estudios cinéticos realizados en las cepas MMY2 y MMY2/LT1/GAP1, el transporte de ambos aminoácidos por la GAP1, exhibe alta afinidad y alta capacidad;

- en células de la cepa MMY2 crecida en los medios MA o YPD, la GAP1 está sujeta a un proceso de represión / inactivación, siendo la actividad de transporte de cada aminoácido similar a la observada en la mutante *gap1* en las mismas condiciones de crecimiento;

- en las cepas mutantes *gap1*, se detectó un sistema para el transporte de isoleucina y valina, con valores de K_T de 0,20 y 0,40 mM respectivamente;

- el sistema de transporte de isoleucina presente en la mutantes *gap1* es regulado negativamente cuando las células son crecidas en medio MA, en cambio el sistema de transporte de valina es poco afectado por la calidad de la fuente de nitrógeno presente en el medio de cultivo;

- en la cepa mutante MMY2/H3/LT1 *gap1let1let2*, se detectó para cada aminoácido un único sistema de transporte, de afinidad similar a la de los sistemas descritos en la mutante *gap1* pero de muy baja velocidad máxima;

- la mutación *let2* que reduce la velocidad de transporte de leucina por el sistema S2 de baja afinidad, disminuyó considerablemente la capacidad de transporte de L-isoleucina y L-valina por los sistemas descritos en la cepa MMY2/H3 *gap1*, sugiriendo la existencia de por lo menos una permeasa común, de baja afinidad, para el transporte de los aminoácidos de cadena ramificada;

**Sistemas transportadores de L-leucina en las tetradas obtenidas
del cruce KE3-R23 x MMY2/H3/LT1**

	Página
V. 1. Entrada e incorporación de L- ¹⁴ C-leucina	94
V. 2. Parámetros cinéticos	102
V. 3. Especificidad de los sistemas transportadores	107
V. 4. Efecto del pH externo	112
V. 5. Efecto del dietilestilbestrol (DES)	114
V. 6. Requerimientos energéticos	115
V. 6. 1. Efecto de la carga energética de la células	115
V. 6. 2. Efecto del 2,4-dinitrofenol	116
V. 6. 3. Efecto de la temperatura	116
V. 7. Determinación del contenido intracelular de aminoácidos libres	116
V. 8. Crecimiento celular en placa	117
V. 8. 1. Aminoácidos como fuente de nitrógeno	117
V. 8. 2. En presencia de análogos tóxicos	119
V. 9. Conclusiones	120

V. Sistemas transportadores de L-leucina en las tetradas obtenidas del cruce KE3-R23 x MMY2/H3/LT1

V. 1. Entrada e incorporación de L-¹⁴C-leucina

Se midió la incorporación de L-¹⁴C-leucina a concentraciones externas 0,05 y 1,0 mM, en seis tetradas que incluyen los tres tipos descritos en Materiales y Métodos. Estos ensayos se realizaron en células crecidas en medios mínimos con prolina (Figuras V. 1 y V. 2) o iones amonio (Figuras V. 3 y V. 4) como fuente de nitrógeno. A partir de los trazados de estas figuras se calcularon las velocidades iniciales de transporte de L-leucina (Tabla V. 1).

En la tetrada KE5-3, tipo parental por el análisis de resistencia a TFL, se encuentran haploides, cuyos comportamientos cinéticos son similares a los observados en las cepas parentales KE3-R23 (cepa KE5-3A) y MMY2/H3/LT1 (cepa KE5-3D), en los dos medios mínimos. En la haploide KE5-3B el transporte de leucina 1,0 mM es similar en células crecidas en ambos medios de cultivo. La segregante KE5-3C presenta características notables, ya que los valores de incorporación del aminoácido así como los de velocidades iniciales, son muy superiores a los observados en la cepa parental KE3-R23 en ambos medios mínimos y a las dos concentraciones externas de leucina ensayadas (Figuras V. 1-V. 4, Tabla V. 1).

Por otra parte, en cada una de las tetradas de tipo no parental (KE5-1 y KE5-6) hay segregantes como 1A, 1D, 6A y 6B (resistentes a TFL hasta 75 μM, genotipo asignado *gap1let1LET2*), cuyas actividades de transporte son similares a la de KE3-R23 en medio MP, pero difieren de ésta en su comportamiento cinético en medio MA (Tabla V. 1), ya que el transporte de L-leucina no resulta disminuído. Esta situación sugiere que la mutación *let1* asociada con la pérdida de actividad del sistema S1, altera la regulación del sistema S2 en medio MA. Otra posibilidad sería una tercera mutación en un gen que regula negativamente el transporte de leucina por el sistema S2, cuando las células son crecidas en medio MA. En las haploides restantes 1B, 1C, 6C y 6D (genotipo *gap1LET1let2*), la actividad de transporte de leucina es similar al de KE3-R23 en medio MA y menor en medio MP.

En las tetradas tetratipo, el análisis del transporte de L-leucina fue complejo y no se pudo asignar, para la mayoría de las segregantes, las mutaciones correspondientes.

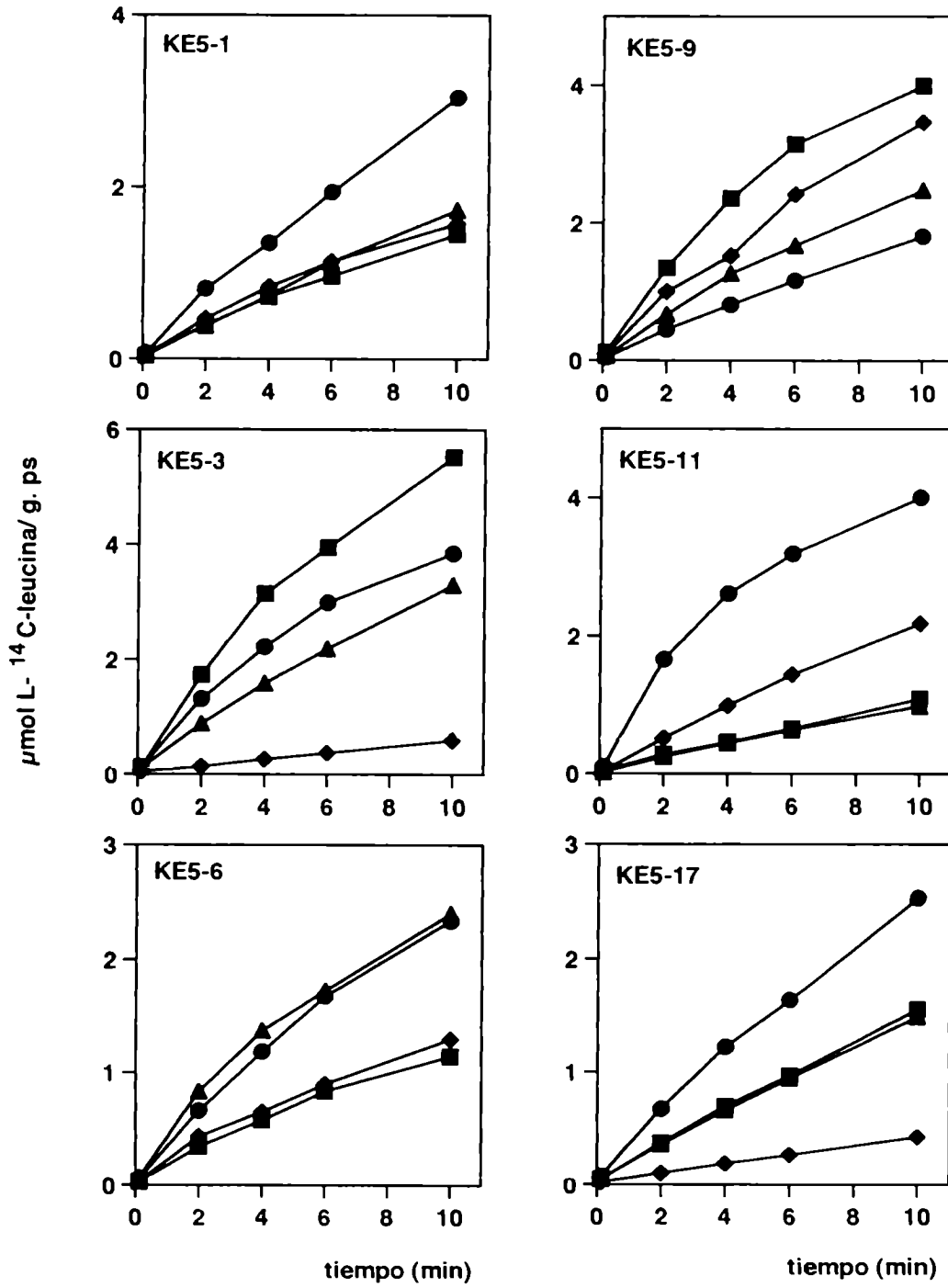


Figura V. 1. Incorporación de L-¹⁴C-leucina 0,05 mM en células de las tetradas KE5-1, 3, 6, 9, 11 y 17 crecidas en medio MP. A (●), B (▲), C (■) y D (◆).

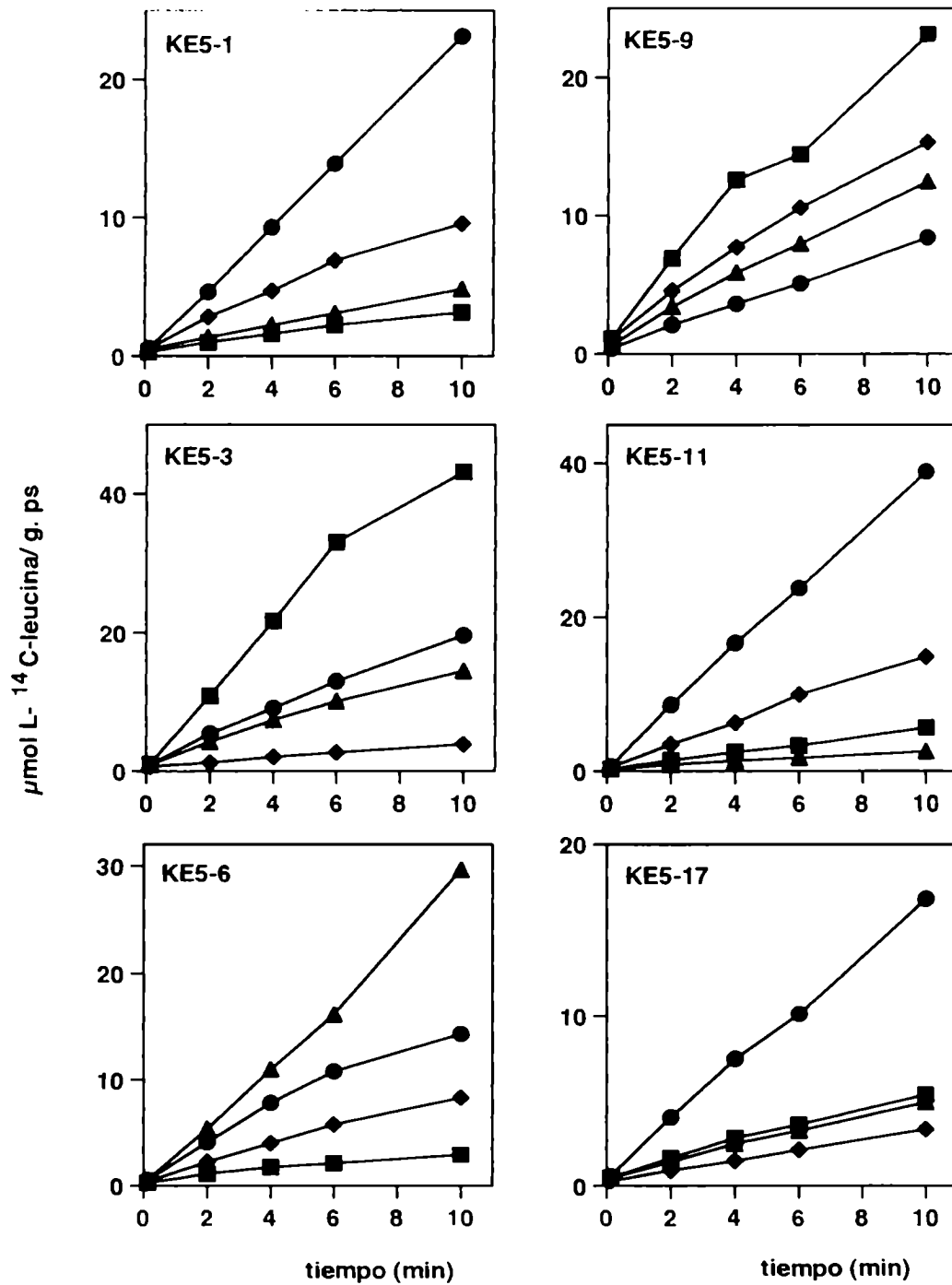


Figura V. 2. Incorporación de L-¹⁴C-leucina 1,0 mM en células de las tetradas KE5-1, 3, 6, 9, 11 y 17 crecidas en medio MP A (●), B (▲), C (■) y D (◆).

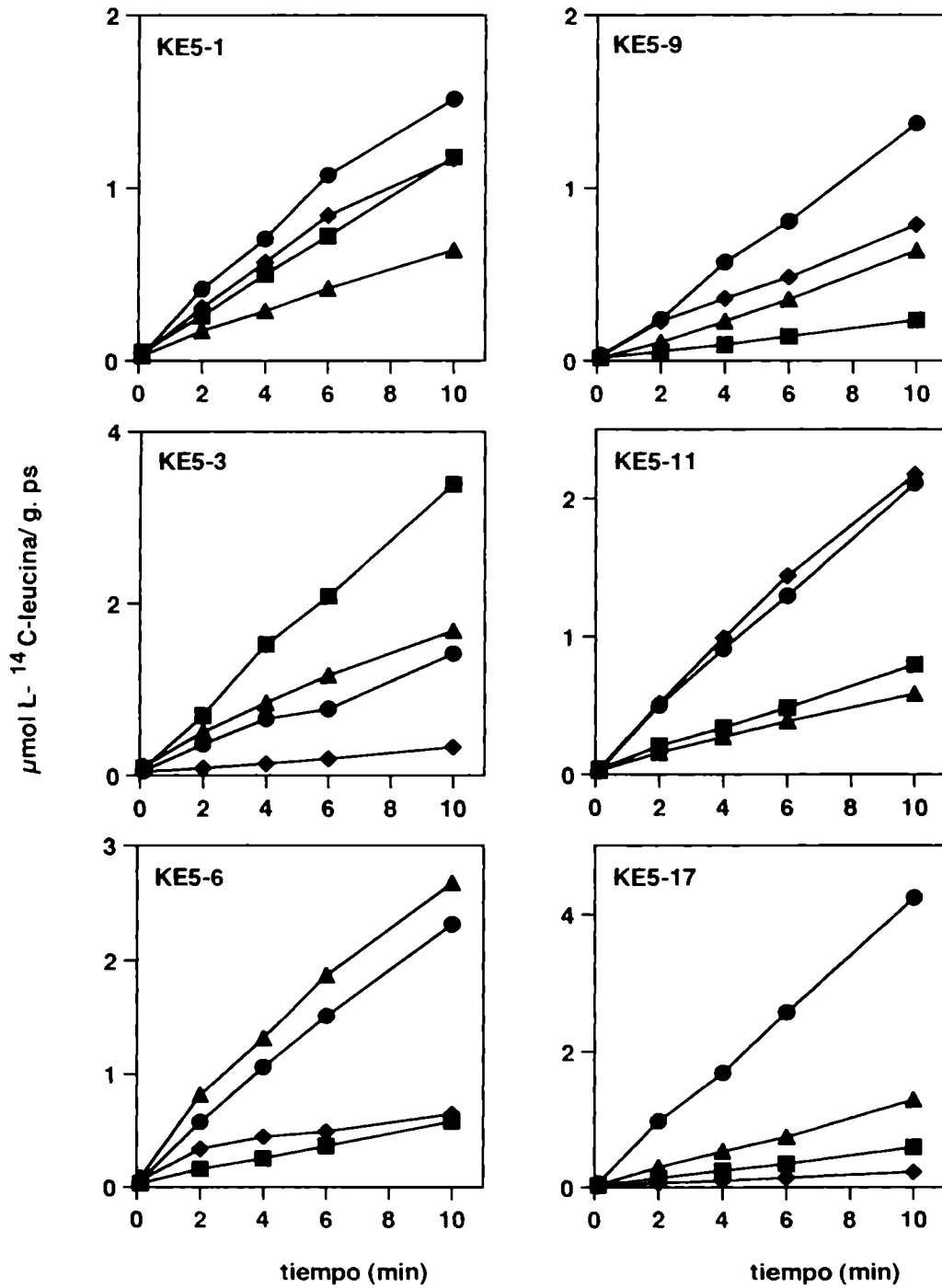


Figura V. 3. Incorporación de L-¹⁴C-leucina 0,05 mM en células de las tetradas KE5-1, 3, 6, 9, 11 y 17 crecidas en medio MA. A (●), B (▲), C (■) y D (◆).

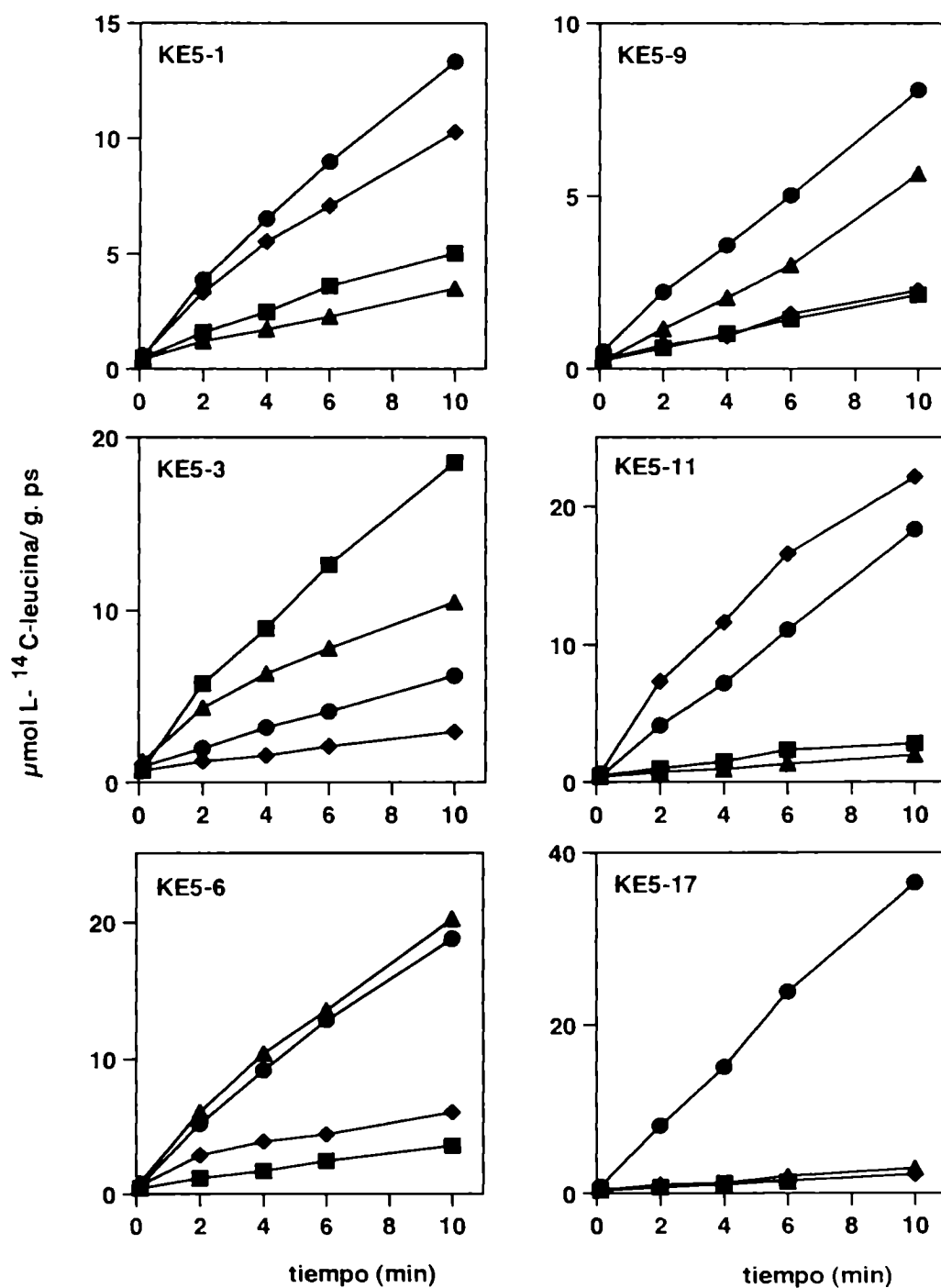


Figura V. 4. Incorporación de L-¹⁴C-leucina 1,0 mM en células de las tetradas KE5-1, 3, 6, 9, 11 y 17 crecidas en medio MA. A (●), B (▲), C (■) y D (◆).

Tabla V. 1. Velocidades iniciales de transporte de leucina en células crecidas en medios mínimos

Cepa	v_i de transporte de L- ¹⁴ C-leucina			
	0,05 mM		1,0 mM	
	MP	MA	MP	MA
KE3-R23	0,43	0,12	1,85	0,36
MMY2/H3/LT1	0,09	0,05	0,56	0,28
KE5 - 1A	0,29	0,17	2,58	1,50
1B	0,22	0,07	0,63	0,32
1C	0,17	0,11	0,47	0,50
1D	0,20	0,13	1,04	1,23
KE5 - 3A	0,60	0,15	2,36	0,57
3B	0,45	0,18	1,54	1,28
3C	0,94	0,36	5,94	2,06
3D	0,06	0,02	0,38	0,22
KE5 - 6A	0,28	0,25	1,82	2,13
6B	0,33	0,31	2,60	2,40
6C	0,14	0,06	0,37	0,32
6D	0,16	0,17	0,90	0,98
KE5 - 9A	0,30	0,04	1,31	0,20
9B	0,19	0,05	0,85	0,45
9C	0,56	0,14	2,86	0,80
9D	0,45	0,13	1,66	0,17
KE5 - 11A	0,63	0,34	4,02	2,75
11B	0,11	0,06	0,27	0,14
11C	0,11	0,08	0,56	0,26
11D	0,24	0,22	1,45	1,71
KE5 - 17A	0,36	0,41	2,53	3,55
17B	0,15	0,12	0,46	0,27
17C	0,15	0,06	0,51	0,23
17D	0,04	0,02	0,30	0,18

Las v_i ($\mu\text{mol L}^{-14}\text{C-leucina min}^{-1} \text{g}^{-1}$) se calcularon a partir de las pendientes de los trazados de las Figuras V.1-V.4.

En células de las tetradas KE5-3 y KE5-17 crecidas en medio complejo YPD, los valores de incorporación de leucina (Figura V. 5), así como los de velocidades iniciales (Tabla V. 2), son aproximadamente similares a los obtenidos por crecimiento en medio MP. La excepción fue la cepa 3C, en la que se detectó una disminución entre 50-60% y la actividad de transporte es similar a la obtenida en medio MA.

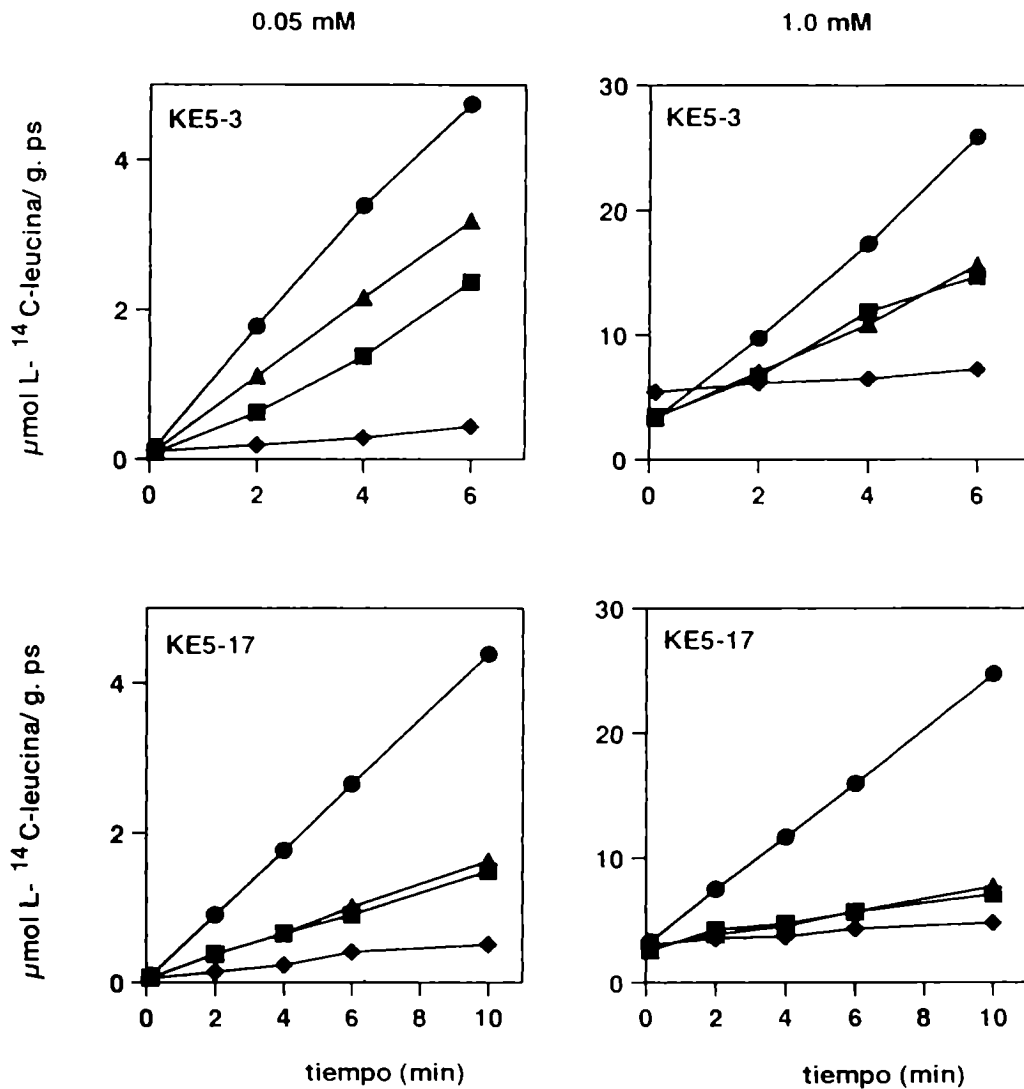


Figura V. 5. Incorporación de L-¹⁴C-leucina 0,05 y 1,0 mM en células de las tetradas KE5-3 y KE5-17 crecidas en medio YPD. A (●), B (▲), C (■) y D (◆).

Este comportamiento cinético fue previamente observado en cepas silvestres con actividad de GAP1 (Kotliar y col., 1994) y para el transporte de isoleucina y valina (Capítulo IV. 1. 1). En células crecidas en medio YPD, la GAP1 es inactivada por un mecanismo de transinhibición debido a la presencia de una fuente compleja de nitrógeno (Wiame y col., 1985). Por lo tanto, para descartar una posible reversión de la mutación *gap1* en la cepa KE5-3C, se midió el transporte de L-¹⁴C-citrulina, un sustrato transportado exclusivamente por el sistema GAP1 en células crecidas en medio MP

(Grenson y col., 1970). Esta cepa es efectivamente *gap1*, siendo la velocidad inicial de transporte del aminoácido menor de $3 \text{ nmol min}^{-1} \text{ g}^{-1}$, valor similar al de otras mutantes *gap1* (Sáenz y col., 1997).

Tabla V. 2. Velocidades iniciales de transporte en células crecidas en medio YPD

Cepa	v_i de transporte de L- ¹⁴ C-leucina	
	0,05 mM	1,0 mM
KE3-R23	0,76	3,08
MMY2/H3/LT1	0,12	0,75
KE5 -3A	0,77	3,77
3B	0,51	2,03
3C	0,38	1,95
3D	0,05	0,29
KE5 -17A	0,43	2,12
17B	0,16	0,47
17C	0,14	0,52
17D	0,06	0,20

Las v_i ($\mu\text{mol L}^{-14}\text{C-leucina min}^{-1} \text{ g}^{-1}$) se calcularon a partir de las pendientes de los trazados de la Figura V. 5.

Varios autores han presentado evidencias de la participación de proteínas de unión, ubicadas en el espacio periplasmático, para el transporte de aminoácidos en levadura (Bussey y Umberger, 1970a; Vorisek, 1972; Opekarova y col., 1975; Wainer y col., 1988). La gran diferencia observada en los valores de incorporación de L-¹⁴C-leucina en las haploides KE5-3C y KE5-3D, ambas resistentes a TFL, podría deberse a la pérdida por mutación de algún componente del espacio periplasmático, necesario para la óptima actividad de transporte. Si esto fuera así, es de esperar que el transporte de L-leucina en protoplastos o en células sometidas a shock osmótico, de la cepa KE5-3C se vea afectado.

Por este motivo, se prepararon protoplastos empleando la metodología descrita en Materiales y Métodos, a partir de células de las cuatro cepas de la tetrada KE5-3 crecidas en medio MP. El transporte de L-¹⁴C leucina 0,05 ó 1,0 mM medido durante 4 minutos fue sólo un 5% del de las células enteras para todas las cepas. La disminución del transporte no se debería a la remoción de la pared celular y el espacio periplasmático, ya que, el transporte de L-¹⁴C-leucina medido en células pretratadas

durante 30 minutos con la solución amortiguadora conteniendo 1% de 2-mercaptoetanol, produce una reducción de casi el 85% de la actividad de transporte. Estos resultados están de acuerdo con los datos de Ohsumi y Anraku (1981), que demostraron que el tratamiento de células de levadura con 2-mercaptoetanol durante la formación de protoplastos, reduce en forma significativa la incorporación de aminoácidos. A este respecto, Kotyk y col., (1985) y Sychrova y Kotyk (1985), postularon que en protoplastos preparados usando 2-mercaptoetanol, la inhibición de la acidificación del medio externo y de la actividad de los sistemas de transporte de solutos, es debida a un mal funcionamiento de la H^+ -ATPasa y a un desacople entre la bomba de H^+ y los sistemas cotransportados con H^+ . Además, Petrov y col., (1992), demostraron que tanto en células enteras como en protoplastos, el ditioneitol (DTT) y el 2-mercaptoetanol, aumentan la permeabilidad de la membrana plasmática a los H^+ causando un colapso del gradiente electroquímico en la membrana.

Por otra parte, las células de las cepas KE5-3C y KE5-3D, fueron sometidas al tratamiento de shock osmótico. La concentración de proteínas presente en el fluido del tratamiento osmótico fue de 0,175 y 0,263 mg/ml para las cepas 3C y 3D, respectivamente, indicando una mayor susceptibilidad de la cepa 3D a este tratamiento. La electroforesis (gentilmente realizada por el Dr. Dell' Angélica) del fluido concentrado de ambas cepas, presentó patrones similares. La actividad de transporte de L - ^{14}C -leucina 1,0 mM, medida en células tratadas de las cepas 3C y 3D, se redujo 40% y 60% respectivamente, comparada con las de las células no tratadas. Teniendo en cuenta, que la solución hipertónica contiene 2-mercaptoetanol, la disminución en la actividad de transporte probablemente se deba a su presencia. Por lo tanto, es altamente improbable que proteínas del espacio periplasmático participen en el proceso de transporte de L -leucina.

V. 2. Parámetros cinéticos

Los parámetros cinéticos de los sistemas de transporte de leucina se determinaron en las tetradas KE5-1, KE5-3 y KE5-17 en células crecidas en medio MP, donde la mayoría de las cepas presentan los más altos valores de entrada del aminoácido.

La velocidad inicial de transporte de L -leucina en función de su concentración externa, se ajusta a una cinética de Michaelis-Menten. Las representaciones de

Lineweaver-Burk o de Eadie-Hofstee, sin embargo, no fueron lineales en todos los casos, como puede observarse en las Figuras V. 6, V. 7 y V. 8. Los parámetros cinéticos calculados a partir de estos resultados se presentan en la Tabla V. 3.

Las cinéticas de transporte de L-leucina en las haploides KE5- 3A y 3B (Figura V. 7. A y B) muestran dos componentes, indicando la presencia de al menos dos sistemas de transporte de L-leucina. En las dos cepas los valores de los parámetros cinéticos son similares a los de la cepa parental KE3-R23 (Tabla III. 7) y a los previamente descritos para los sistemas S1 y S2 (Ramos y col., 1980; Kotliar y col., 1994). A estas cepas les fueron asignados los alelos normales *LET1* y *LET2*.

Tabla V. 3. Parámetros cinéticos

Cepa	K_{T1}	$J_{m\acute{a}x1}$	K_{T2}	$J_{m\acute{a}x2}$
KE5- 1A	-	-	0,31	2,73
1B	0,04	0,30	-	-
1C	0,03	0,26	-	-
1D	-	-	0,22	1,37
KE5- 3A	0,03	0,54	0,39	2,08
3B	0,02	0,43	0,33	1,85
3C	-	-	0,32	5,58
3D	-	-	0,34	0,19
KE5- 17A	-	-	0,19	1,77
17B	0,04	0,33	-	-
17C	0,03	0,36	-	-
17D	-	-	0,47	0,33

Los valores se calcularon a partir de las representaciones de Lineweaver-Burk o de Eadie-Hofstee. K_T y $J_{m\acute{a}x}$ se expresan en mM y $\mu\text{mol min}^{-1} \text{g}^{-1}$ respectivamente.

En las cepas 3D (Figura V. 7) y 17D (Figura V. 8), que son completamente resistentes a TFL 100 μM , se identificó un único sistema de transporte de L-leucina de afinidad similar al del sistema S2, pero de baja capacidad y no se detectó el componente de alta afinidad. Los valores de los parámetros cinéticos son similares a los calculados para la cepa parental MMY2/H3/LT1 (Tabla III. 7). Por lo tanto, se considera que las haploides 3D y 17D llevan ambos alelos mutados, *let1 let2*.

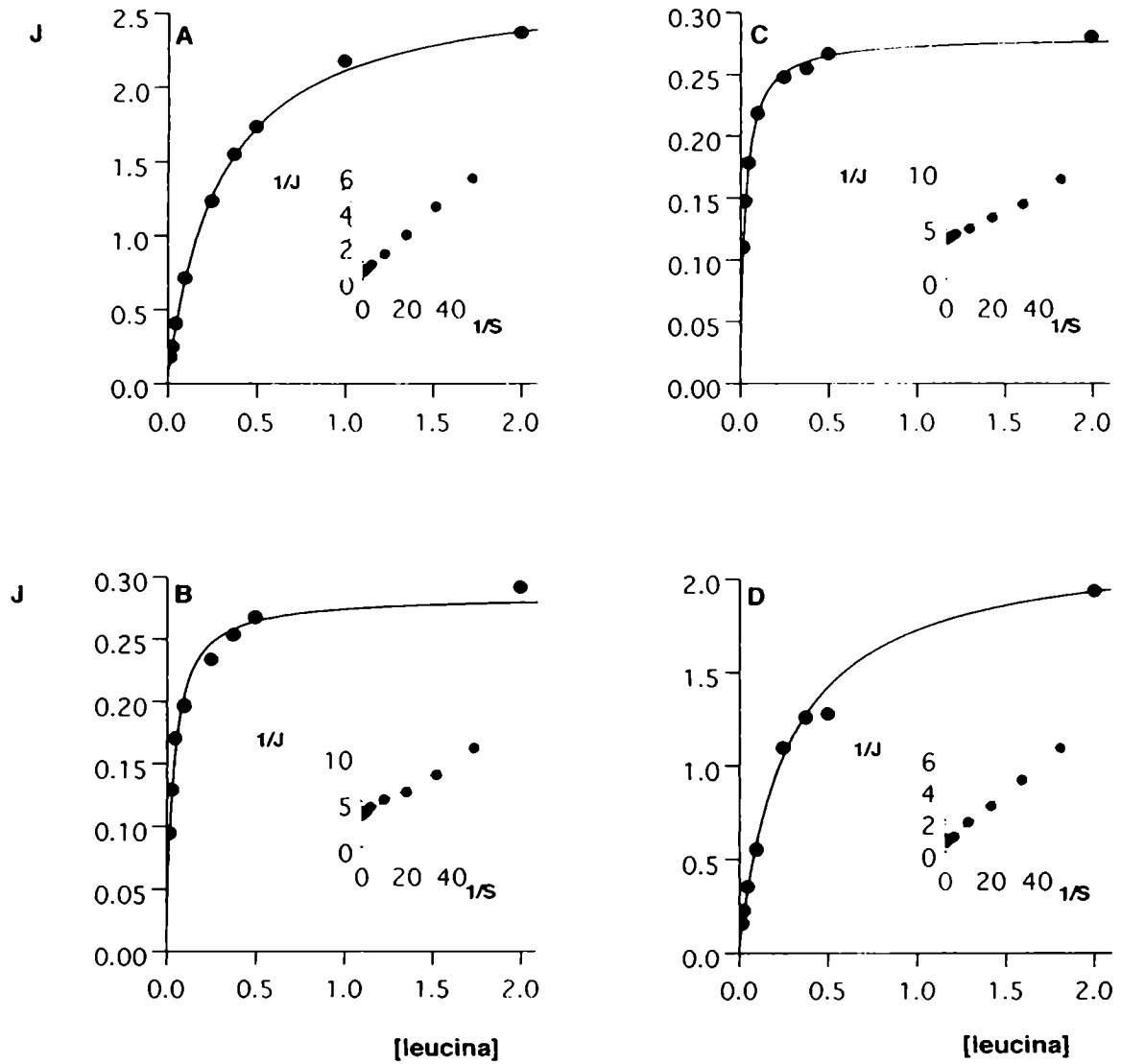


Figura V. 6. Cinética de transporte de L-leucina en células de la tetrada KE5- 1A, 1B, 1C y 1D crecidas en medio MP.

Inset : representación de Lineweaver-Burk.

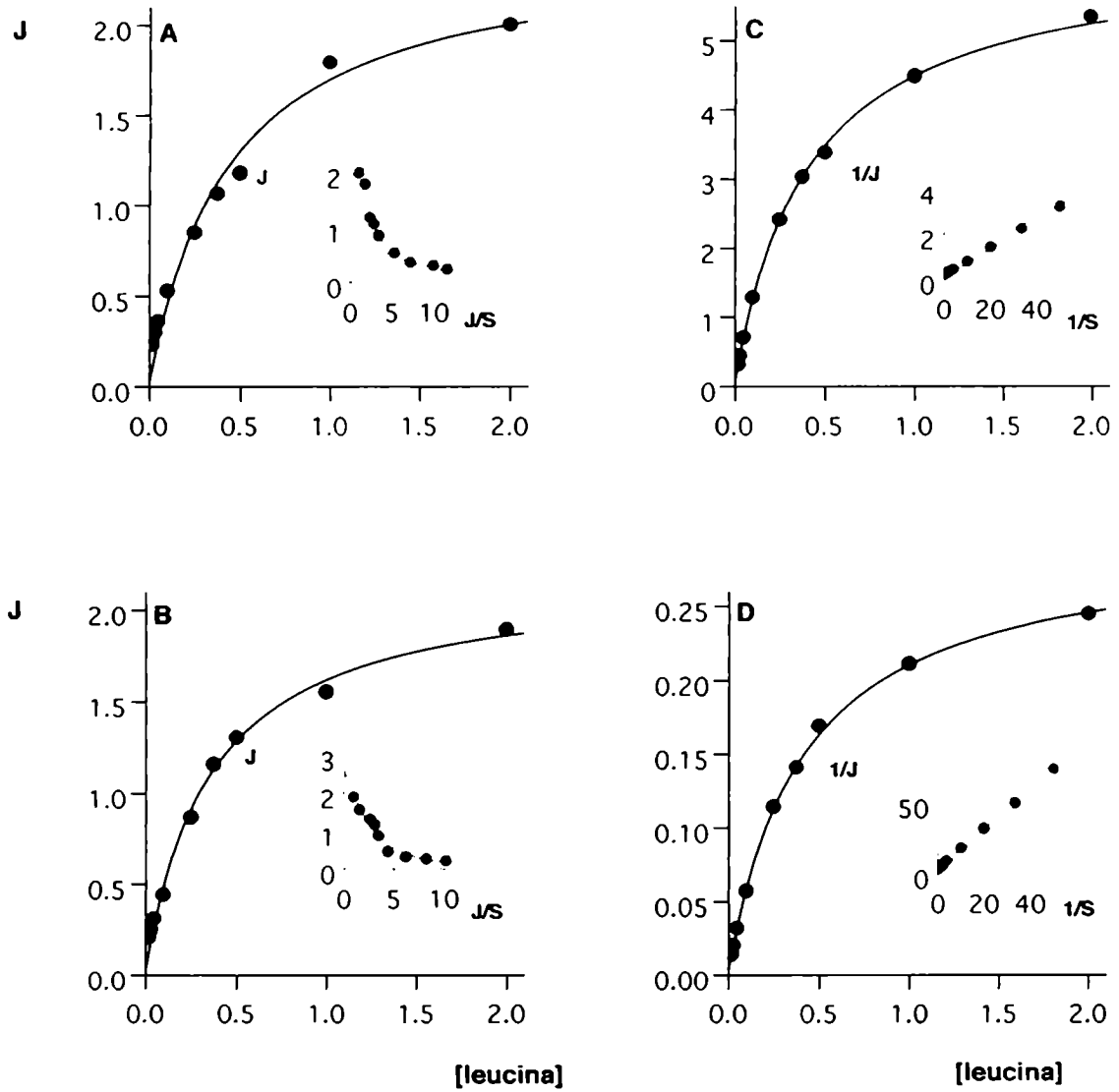


Figura V. 7. Cinética de transporte de L-leucina en células de la tetrada KE5- 3A, 3B, 3C y 3D crecidas en medio MP.

Inset: cepas 3A y 3B, representación de Eadie-Hofstee

cepas 3C y 3D, representación de Lineweaver-Burk.

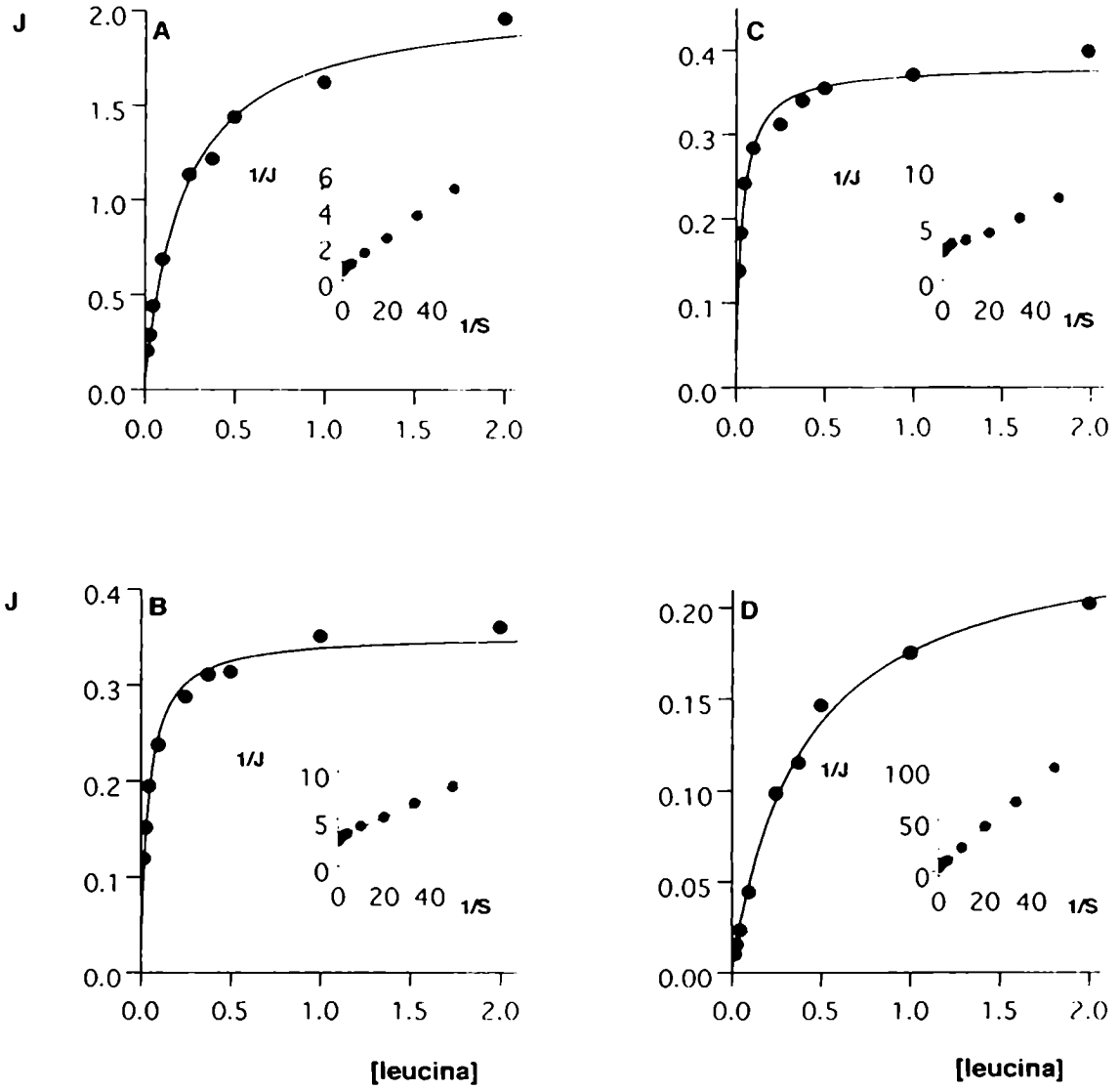


Figura V. 8. Cinética de transporte de L-leucina en células de la tetrada KE5- 17A, 17B, 17C y 17D crecidas en medio MP.

Inset : representación de Lineweaver-Burk.

En las cepas 1B, 1C, 17B y 17C (Figuras V. 6 y V. 8) que son sensibles o débilmente resistentes a TFL, opera un único sistema de transporte de leucina de alta afinidad y baja capacidad, similar al sistema S1 identificado en la cepa parental KE3-R23 y no se detecta cinéticamente actividad del otro sistema, indicando que estas cepas llevan la mutación *let2*.

Las cepas 1A, 1D, 3C y 17A (Figuras V. 6 - V. 8) también presentan un único componente, pero de afinidad y capacidad en el orden del sistema S2, no detectándose actividad del sistema S1 (Tabla V. 3), asignándoles el alelo mutado *let1*.

Estos resultados indican una segregación 2:2 del gen *LET1*, ya que en cada una de los tres tipos de tetradas, hay dos haploides en las que se detecta el sistema S1 y otras dos en las que no se lo detecta. La pérdida de actividad de la permeasa S1 de alta afinidad y baja capacidad (mutación *let1*), conduce al desarrollo del componente mayor de la resistencia a TFL, haploides 1A, 1D, 3C, 3D, 17A y 17D, (Materiales y Métodos, Tabla II. 1).

Con respecto a la segregación del gen *LET2*, la interpretación de los resultados sugieren la presencia de una tercera mutación en la cepa MMY2/H3/LT1 que podría interferir con la incorporación de L-leucina por el sistema S2. En la tetrada KE5-3 considerada parental, las cuatro haploides presentan valores de K_T similares al del sistema S2, mientras que las $J_{m\acute{a}x}$ son en dos cepas (3A y 3B) similares al de la cepa KE3-R23, en otra es más del doble que el valor obtenido en la cepa KE3-R23 y en la cepa 3D, es similar al de la otra cepa parental, MMY2/H3/LT1 (Tablas III. 7 y V. 3). En la tetrada KE5-17, tetratipo por el análisis de la resistencia a TFL, se le asignó a la haploide 17C los alelos normales *LET1 LET2*, sin embargo, no se detectó cinéticamente la presencia del sistema S2, en las haploides restantes y en la tetrada KE5-1 la segregación de los genes fueron como se esperaban: *gap1let1* cepas 1A, 1D, 17A; *gap1let2* cepas 1B, 1C, 17B y *gap1let1let2* cepa 17D.

V. 3. Especificidad de los sistemas transportadores

La especificidad de sustrato se encuentra entre los criterios más comunes para distinguir un tipo de sistema de transporte de otro. Por esta razón, se estudió el transporte de L-¹⁴C-leucina en presencia de otros aminoácidos no radiactivos.

En los ensayos realizados en las tetradas KE5- 1, 3, 6, 9, 11, 17 se utilizaron L-leucina, DL-TFL y L-prolina, como competidores del transporte de L-¹⁴C-leucina (Tabla V. 4).

En las haploides donde ha sido caracterizado cinéticamente sólo el sistema de transporte de leucina de alta afinidad y baja capacidad (cepas 1B, 1C, 17B y 17C), se observa que la inhibición por leucina es entre 70-80% y la inhibición por TFL supera el 55% (Tabla V. 4) a la concentración de L-¹⁴C-leucina externa 0,05 mM. Menores valores de inhibición se obtuvieron a la concentración 1,0 mM del aminoácido radiactivo. Estas mismas características fueron observadas en las cepas 6C y 11B.

En las cepas que presentan sólo actividad del sistema de baja afinidad, independientemente de su capacidad (cepas 1A, 1D, 3C, 3D, 17A y 17D), la inhibición por leucina fue entre 30-60% y prácticamente no se produce inhibición por TFL (menos del 15%), cuando se ensayó a 0,05 mM de concentración externa de L-¹⁴C-leucina (Tabla V. 4). En cambio, a la concentración 1,0 mM se produce un aumento en los valores de inhibición por leucina y TFL. Las cepas 6A, 6B, 9B, 9C, 11A y 11D se identificaron como pertenecientes a este grupo.

En las cepas 3A y 3B, donde se caracterizaron dos sistemas de transporte de leucina, la inhibición por TFL es similar (30-40%) para ambas concentraciones externas de leucina radiactiva. Estos resultados se repitieron en las cepas 6D, 9A, 9D y 11C.

L-prolina no inhibió el transporte de L-leucina en ninguna de las cepas de las seis tetradas estudiadas.

Por lo tanto, la inhibición del transporte de leucina por TFL constituye una forma simple de discriminar qué sistema está presente en una determinada cepa.

Por otra parte, estos resultados están de acuerdo con los valores de los parámetros cinéticos del transporte de L-leucina, obtenidos en las cepas analizadas. Así, TFL produce una inhibición significativa del transporte de L-leucina en las cepas en que éste es mediado únicamente por el sistema S1 de alta afinidad, mientras que en las cepas que carecen del mismo no se produce inhibición y, además, son resistentes a TFL, confirmando que el desarrollo de la resistencia está ligado a la mutación *let1*.

Dadas las características cinéticas observadas en las segregantes de las tetradas KE5-3 y KE5-17, este estudio se amplió utilizándose como competidores L-isoleucina, L-valina, L-norleucina y L-metionina (Tablas V. 5 y V. 6).

Tabla V. 4. Ensayo de inhibición del transporte de L-leucina en las tetradas KE5 -1, 3, 6, 9, 11 y 17

Adiciones	L- ¹⁴ C-leucina externa							
	0,05 mM				1,0 mM			
	1A	1B	1C	1D	1A	1B	1C	1D
control *	1,37	0,55	0,38	0,38	7,04	1,78	1,46	2,18
L-leucina	56	77	68	56	84	58	51	58
DL-TFL	10	58	53	14	45	48	43	30
L-prolina	8	7	0	5	3	8	7	0

	3A	3B	3C	3D	3A	3B	3C	3D
control *	1,89	1,59	2,49	0,64	6,88	5,97	18,68	2,42
L-leucina	56	54	47	32	71	71	83	51
DL-TFL	33	30	5	2	32	32	39	29
L-prolina	0	2	1	3	6	9	6	0

	6A	6B	6C	6D	6A	6B	6C	6D
control *	1,01	1,50	0,42	0,64	5,24	11,30	1,29	3,78
L-leucina	62	56	72	55	83	84	61	81
DL-TFL	1	10	51	20	38	39	48	38
L-prolina	0	0	6	0	6	9	6	0

	9A	9B	9C	9D	9A	9B	9C	9D
control *	0,79	0,49	1,13	1,25	3,37	3,14	7,00	5,36
L-leucina	65	51	48	66	74	63	77	73
DL-TFL	31	10	10	40	37	33	38	41
L-prolina	4	8	6	1	8	2	6	4

	11A	11B	11C	11D	11A	11B	11C	11D
control *	3,45	0,50	0,74	1,16	20,32	1,49	3,34	6,73
L-leucina	56	75	65	61	87	58	85	82
DL-TFL	13	54	36	11	48	45	42	43
L-prolina	3	10	4	1	9	6	0	2

	17A	17B	17C	17D	17A	17B	17C	17D
control *	1,20	0,71	0,78	0,12	3,34	1,84	1,81	0,85
L-leucina	58	78	81	40	72	67	70	44
DL-TFL	8	65	62	2	28	54	55	35
L-prolina	8	3	7	12	0	0	0	5

Las células crecieron en medio MP. Los aminoácidos competidores fueron adicionados a una concentración 10 veces mayor que la del aminoácido radiactivo. *control: $\mu\text{mol L-}^{14}\text{C-leucina g}^{-1}$ incorporados en 3 minutos. Los números representan % de inhibición de los controles.

Estos aminoácidos inhibieron el transporte de L-leucina en todas las segregantes, las inhibiciones son mayores al aumentar la concentración externa de leucina radiactiva, excepto para las cepas 17B y 17C, donde la situación se invirtió. L-citrulina no inhibió el transporte de L-leucina ya que todas las cepas son *gap1*. Tampoco cicloleucina resultó efectivo como inhibidor, el efecto de D-metionina fue limitado, causando entre 20-30% de inhibición en las cepas 3C y 3D en las que opera un sistema de transporte de leucina de baja afinidad.

Tabla V. 5. Ensayo de inhibición del transporte de L-leucina en la tetrada KE5-3

Adiciones	L- ¹⁴ C-leucina externa							
	0,05 mM				1,0 mM			
	3A	3B	3C	3D	3A	3B	3C	3D
L-isoleucina	66	67	58	40	81	79	88	43
L-valina	37	36	29	21	58	59	72	28
L-norleucina	74	72	69	58	87	87	93	62
cicloleucina	0	10	3	8	10	6	15	12
L-metionina	58	58	57	45	75	71	88	61
D-metionina	6	4	0	0	0	0	20	26
L-citrulina	3	4	0	0	6	8	5	10

Las células crecieron en medio MP. Los aminoácidos competidores fueron adicionados a una concentración 10 veces mayor que la del aminoácido radiactivo. Los valores controles son los de la Tabla V. 4. Los números representan % de inhibición de los controles.

Tabla V. 6. Ensayo de inhibición del transporte de L-leucina en la tetrada KE5-17

Adiciones	L- ¹⁴ C-leucina externa							
	0,05 mM				1,0 mM			
	17A	17B	17C	17D	17A	17B	17C	17D
L-isoleucina	64	71	69	57	87	52	60	47
L-valina	46	53	52	42	59	44	49	28
cicloleucina	12	5	9	0	18	8	4	14
L-metionina	73	55	55	42	82	38	53	44
L-citrulina	10	7	9	13	0	0	0	7

Las células crecieron en medio MP. Los aminoácidos competidores fueron adicionados a una concentración 10 veces mayor que la del aminoácido radiactivo. Los valores controles son los de la Tabla V. 4. Los números representan % de inhibición de los controles.

Para estudiar más exhaustivamente la especificidad de cada sistema de transporte, se seleccionaron las cepas 17B y 3C, utilizándose una variedad de α -aminoácidos proteicos y no proteicos, aminoácidos con el grupo amino en posición distinta de α y análogos estructurales de leucina como competidores (Tabla V. 7).

Tabla V. 7. Especificidad de los sistemas de transporte de leucina S1 y S2.

Adiciones	% Inhibición	
	17B (S1)	3C (S2)
L-lisina	12	19
L-arginina	16	30
L-ornitina	0	4
L-histidina	0	22
L-aspartato	14	59
L-glutamato	9	51
L-serina	15	78
L-treonina	6	80
L-cisteína	42	80
DL-homocisteína ¹	50	73
L-tirosina ²	16	40
L-asparagina	5	80
L-gutamina	2	63
L-alanina	8	62
L- α -aminobutirato	19	75
L-norvalina	54	78
L-norleucina	69	93
L- γ -metil-leucina	45	66
L- <i>allo</i> -isoleucina	27	31
D-leucina	10	30
D-leucina ³	27	32
D-leucina ⁴	41	36
4-aza-DL-leucina ¹	0	11
2-DL-aminooctanoico ¹	24	88
L-fenilalanina	58	66
L-triptofano	13	57
L- γ -aminobutirato	4	10
L- δ -aminolevulinato	8	0
L- ϵ -aminocaproato	ND	0

Las células crecieron en medio MP. Los valores controles, luego de 3 min de incubación, fueron para las cepas 17B y 3C: 0,71 y de 18,68 $\mu\text{mol L-}^{14}\text{C-leucina g}^{-1}$ a una concentración de leucina externa 0,05 y 1,0 mM, respectivamente. Los aminoácidos fueron adicionados a una concentración 10 veces mayor a la de leucina radiactiva. ¹DL-aminoácidos (20X). ² (8,25X) para la determinación en la cepa 3C. ³ (50X) y (25X) para las determinaciones en las cepas 17B y 3C, respectivamente. ⁴ (100X) y (37,5X) para las determinaciones en las cepas 17B y 3C, respectivamente.

Como puede observarse en la Tabla V. 7, en la cepa 17B *gap1let2*, el transporte de L-leucina es inhibido significativamente por L-cisteína, DL-homocisteína, L-fenilalanina y por los análogos estructurales de leucina, como L-norvalina, L-norleucina y L- γ -metil leucina. Menores valores de inhibición, entre 20-30%, fueron obtenidos con L- α -aminobutirato, L-*allo*-isoleucina y DL-2 aminooctanoico. La inhibición por D-leucina sólo resultó significativa cuando se la adiciona en una concentración 100 veces mayor que la de L-leucina radiactiva. El resto de los aminoácidos ensayados produjeron inhibiciones menores del 15%.

Los resultados obtenidos indican que la permeasa de alta afinidad del transporte de leucina, tiene una especificidad restringida a un grupo de aminoácidos hidrofóbicos estructuralmente relacionados y de configuración L. La excepción a esta regla es la inhibición producida por L-cisteína que posee un grupo sulfhidrilo que le confiere polaridad.

En el caso de isoleucina que posee dos átomos de carbono asimétricos también discrimina la forma L-*allo*. La longitud de la cadena lateral es un requerimiento importante en los sustituyentes que son hidrocarburos alifáticos, si es lineal debe ser de 3 ó 4 átomos de carbono y si es ramificada entre 3-5 átomos de carbono.

En contraste, el sistema de transporte de leucina de baja afinidad y alta capacidad detectado en la cepa 3C, es inhibido entre 50-90% por la mayor parte de los aminoácidos ensayados. Solamente los aminoácidos con el grupo amino en posición distinta de α no produjeron inhibición. L-lisina, L-arginina, L-histidina y D-leucina causaron un efecto limitado (20-30%).

Por lo tanto, el sistema de baja afinidad de transporte de leucina es de amplia especificidad y nuevamente se pone de manifiesto la semejanza con la GAP1, pero a diferencia de ésta, no transporta significativamente lisina y arginina.

V. 4. Efecto del pH externo

En la Figura V. 9 se observa la incorporación de L-¹⁴C-leucina 0,05 y 1,0 mM en función del pH externo. Las determinaciones se efectuaron en todas las cepas de la tetrada KE5-3 y en la cepa KE5-17B.

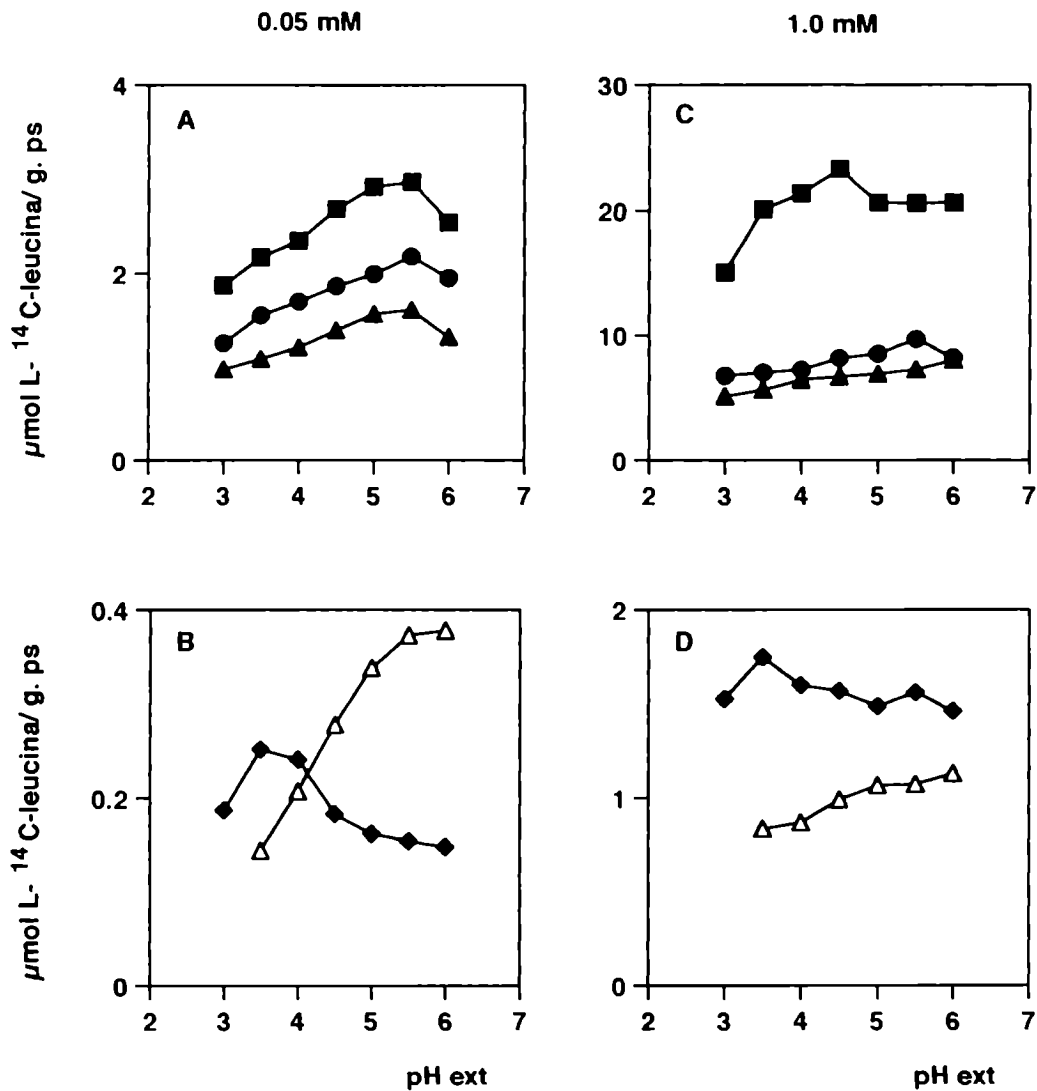


Figura V. 9. Efecto del pH externo sobre el transporte de L-leucina en las cepas de la tetrada KE5-3 A (●), 3B (▲), 3C (■) y 3D (◆) y en la cepa KE5-17 B (Δ). La incorporación de L-¹⁴C-leucina 0,05 (A y B) y 1,0 mM (C y D) se midió a 3 minutos en células crecidas en medio MP

Las cepas donde se han identificados dos sistemas de transporte de leucina (3A y 3B) o un único sistema de alta afinidad (17B), la actividad es máxima a pH 5,5-6,0. Este valor de pH óptimo es similar al hallado en la cepa parental KE3-R23.

A este valor de pH externo corresponde un incremento entre el 45-65% en el valor de entrada de L-leucina, a excepción de la cepa 17B, en la cual el aumento observado fue de 2,6 veces a la concentración externa 0,05 mM.

En cambio, en la segregante 3D que posee similares características cinéticas a la cepa parental mutante MMY2/H3/LT1, el pH óptimo es 3,5 y la dependencia de la concentración externa de protones es más importante a la menor concentración externa de leucina.

En la cepa 3C la máxima actividad se alcanza a pH 5,5 y 4,5 para L-leucina externa 0,05 y 1,0 mM, respectivamente.

V. 5. Efecto del dietilestilbestrol (DES)

Para el transporte de aminoácidos en levadura, se considera que la energía acumulada en el gradiente electroquímico de protones, generado por la H⁺-ATPasa de membrana plasmática, actúa como fuerza impulsora del proceso. El dietilestilbestrol (DES) es *in vitro* un inhibidor de la actividad de la H⁺-ATPasa de membrana plasmática (Eddy, 1982; Goffeau y col., 1981; Serrano, 1980).

Por esta razón, se estudió el efecto del DES 50 μM, sobre el transporte de L-¹⁴C-leucina en células de las tetradas KE5-3 y KE5-17 (Tabla V. 8). En las condiciones experimentales ensayadas, únicamente en las cepas con actividad del sistema de baja afinidad, independientemente de su capacidad, la inhibición por DES fue significativa.

Tabla V. 8. Efecto del dietilestilbestrol

Cepa	L - ¹⁴ C-leucina externa			
	0,05 mM		1,0 mM	
	Control	% Inh	Control	% Inh
3A	0,40	6	1,57	22
3B	0,33	14	1,68	15
3C	0,39	57	1,99	30
3D	0,25	47	1,56	7
17A	0,24	32	1,31	38
17B	0,24	20	0,81	6
17C	0,22	1	1,20	14
17D	0,09	20	0,49	5

Las células crecieron en medio MP. La suspensión celular conteniendo DES 50 μM y etanol 10% se preincubó durante 5 minutos antes de la adición de L-¹⁴C-leucina, los controles contenían etanol 10%. La entrada a 3 minutos de L-¹⁴C-leucina se expresa en μmol g⁻¹.

V. 6. Requerimientos energéticos

V. 6. 1. Efecto de la carga energética de las células

Dada la diferente actividad de transporte de leucina observada en las cepas KE5-3C y 3D, se estudió el efecto de la carga energética de las células sobre el transporte del aminoácido. Los ensayos se realizaron en células ayunadas y células energizadas tal como se describió en Materiales y Métodos. Los resultados se muestran en la Tabla V. 9.

En las dos cepas, la actividad de transporte de leucina aumentó en la misma proporción (3 veces) cuando las células ayunadas son energizadas por preincubación con glucosa 5 mM. Estos resultados indican que la disminución en la capacidad de transporte de L-leucina observada en la cepa 3D, no se debe a alteraciones en los sistemas productores de energía. Más aún, la energización restaura los valores de entrada que se obtienen sin tratamiento previo de las células y la disminución en el transporte del aminoácido en células ayunadas se produce por un agotamiento de los dadores de energía endógenos.

Tabla V. 9. Efecto de la condición metabólica y del DNP.

Cepa	Condición metabólica	DNP 50 μ M	L- ¹⁴ C-leucina externa			
			0,05 mM	%inh	1,0 mM	%inh
3C	Ayunada	-	1,25		7,44	
		+	0,49	61	2,21	70
	Energizada	-	3,66		23,09	
		+	1,48	60	6,24	73
3D	Ayunada	-	0,08		1,05	
		+	0,04	50	0,43	59
	Energizada	-	0,22		2,61	
		+	0,14	36	1,13	57

Las células crecieron en medio MP y fueron ayunadas y energizadas como se describió en Materiales y Métodos. La entrada a 4 minutos de L-¹⁴C-leucina se expresa en μ mol g⁻¹

En la cepa 3C se determinaron los parámetros cinéticos del transporte de leucina en ambas condiciones metabólicas. Los valores de la constante de afinidad son

similares en células ayunadas y células energizadas ($K_T = 0,37-0,39$ mM), este resultado indica que se trata de la misma permeasa y que el sistema es constitutivo.

V. 6. 2. Efecto del 2,4- dinitrofenol

La inhibición de la entrada de leucina por acción de desacoplantes como el 2,4-dinitrofenol (DNP), ha sido descrita por varios autores (Ballarin-Denti y col., 1984; Bongioanni y Ramos., 1988; Ramos y col., 1980).

La adición de DNP junto con el aminoácido radiactivo, tanto en células ayunadas como energizadas de las cepas 3C y 3D, provoca una disminución entre 36-73% en los valores de entrada de leucina (Tabla V. 9). Sin embargo, en la cepa 3D el transporte de leucina no es concentrativo en células ayunadas; en células energizadas, el aminoácido es acumulado a partir de los 4 minutos de incubación. Para el DNP, además del efecto de transporte de protones extracelulares, también se ha descrito su capacidad para permanecer unido a componentes de la membrana (Hoeberichts y col., 1980), como consecuencia, no sólo disminuiría el ΔpH , sino que afectaría el ligado del aminoácido a las entidades responsables de su reconocimiento. Esto explicaría porque el DNP inhibe los valores de entrada aunque la cepa 3D no acumula el aminoácido.

V. 6. 3. Efecto de la temperatura

En células de la cepa KE5-3D, la baja actividad de transporte de L-leucina no se debe a un proceso de difusión, ya que no se detecta incorporación de leucina a 0 °C. El ligado inespecífico corresponde a 17 y 370 nmol g⁻¹ para L-leucina externa 0,05 y 1,0 mM, respectivamente, valores que no se modifican con el tiempo de incubación. Resultados análogos se obtuvieron en la cepa parental mutante MMY2/H3/LT1 (Capítulo III. 2. 1).

V. 7. Determinación del contenido intracelular de aminoácidos libres

En la Tabla V. 10 se observan las concentraciones intracelulares de aminoácidos libres en células de la tetrada KE5-3 y en la cepa KE5-17B. En la mayoría de las cepas y en general para los aminoácidos analizados, los valores determinados se encuentran

comprendidos entre los valores obtenidos para las cepas parentales KE3-23 y MMY2/H3/LT1 (Tabla III. 9).

Tabla V. 10. Concentraciones intracelulares (mM) de aminoácidos libres

Aminoácido	3A	3B	3C	3D	17B
leucina	3,25	0,96	0,87	1,02	0,31
isoleucina	3,39	3,01	1,03	1,88	1,70
valina	2,81	1,50	2,13	2,10	3,15
glicina/alanina	18,72	15,45	11,39	22,34	33,59
treonina/serina	23,70	8,89	16,62	17,73	21,32
fenilalanina	0,50	0,30	0,52	0,37	0,11
tirosina	0,61	0,44	0,53	0,51	0,14
histidina	ND	ND	2,16	ND	2,14
arginina	21,16	4,03	3,47	6,44	17,28
aspartato	5,78	2,10	4,23	4,80	6,49
glutamato	46,64	31,47	68,34	53,81	58,77
prolina	13,40	ND	36,58	ND	16,85

Las células crecieron en medio MP y el reservorio intracelular de aminoácidos se analizó como se describió en Materiales y Métodos. ND: no determinado.

V. 8. Crecimiento celular en placa

V. 8. 1. Aminoácidos como fuente de nitrógeno.

Para discriminar si las mutaciones *let1* o *let2* son responsables de los defectos en el crecimiento celular observados en la cepa parental MMY2/H3/LT1 (Tabla III. 9), células de las tetradas KE5-3 y KE5-17 crecieron en medio sólido, utilizando los aminoácidos listados en la Tabla V. 11 como única fuente de nitrógeno, sobre los cuales la cepa MMY2/H3/LT1 no crece.

Crecimiento similar al de la cepa parental *gap1*, fue observado en las segregantes 3A y 3B, en las cuales el transporte de L-leucina es mediado por los sistemas S1 y S2 y en las segregantes 3C y 17A, que presentan solamente un sistema de baja afinidad y alta capacidad, S2. En contraste, las cepas 3D y 17D presentan los mismos defectos en el crecimiento observados en la otra cepa parental *gap1let1let2*.

En las cepas 17B y 17C en las que se detectó solamente el sistema de alta afinidad y baja capacidad, S1, el crecimiento sobre cada uno de los aminoácidos de cadena ramificada y sobre norleucina, metionina y fenilalanina fue menor que el

observado en la cepa *gap1* pero mayor que en la cepa *gap1let1let2*. En cambio no se produjo crecimiento de estas cepas sobre treonina y serina, tal como fue observado en la cepa *gap1let1let2* y en las haploides 3D y 17D.

Tabla V. 11. Efecto de diferentes aminoácidos sobre el crecimiento celular de las cepas de las tetradas KE5-3 y KE5-17.

Aminoácido	3A	3B	3C	3D	17A	17B	17C	17D
leucina	3	3	3	1	3	2	2	1
isoleucina	3	3	3	0	3	1/2	1/2	0
valina	3	3	3/4	1	3/4	2	2	1
norleucina	3	3	2/3	1/2	3	1/2	1/2	1/2
norvalina	3	3	3/4	2	3/4	3	3	2
treonina	2/3	2/3	3	1	3	1	1	1
serina	3	3	3	1	3	1	1	1
metionina	2/3	2/3	2/3	1	2/3	2	2	1
fenilalanina	2	2	2	0	2	1/2	1/2	0

Las células fueron crecidas en medio mínimo sólido durante 3 días con la adición de un único aminoácido (1mM) como fuente de nitrógeno. La producción del crecimiento se evaluó por medio de una escala empírica. Crecimiento 5: muy intenso; 4: denso; 3: moderado; 2: escaso; 1: trazas y 0: no crecimiento.

La limitada capacidad de transporte de la permeasa S1 (codificada por el gen *LET1*) se refleja en la utilización disminuida de los aminoácidos de cadena ramificada como fuentes de nitrógeno. Sin embargo, el resultado más sorprendente es la falta de crecimiento de las cepas 17B y 17C sobre treonina y serina, indicando que el gen *LET1* no es requerido para el transporte de treonina y serina. Estos resultados, junto con los estudios cinéticos y los ensayos de competencia, sugieren que *LET2* codifica un componente del sistema S2 requerido para el transporte y/o utilización no sólo de los aminoácidos de cadena ramificada, sino también de treonina y serina.

Por el contrario, la pérdida de actividad de la permeasa de alta afinidad y baja capacidad, mutantes *gap1let1* como las cepas 3C y 17A, no afectó el crecimiento sobre ninguna de las fuentes de nitrógeno estudiadas. Estos resultados indican que en ausencia de la permeasa general de aminoácidos, GAP1, el sistema S2 es primariamente responsable para el transporte y utilización catabólica de esas fuente de nitrógeno.

V. 8. 2. En presencia de análogos tóxicos

Las células de las tetradas KE5-3 y KE5-17 fueron crecidas en medio mínimo sólido con prolina como fuente de nitrógeno y la adición de un análogo tóxico. En la Tabla V. 12 se resumen los resultados obtenidos y se incluyen los de ambas cepas parentales de la Tabla III. 11.

Las cepas de las dos tetradas resultaron sensibles a la presencia de L-canavanina y β -cloroalanina y resistentes en presencia de D-norleucina y azaleucina en el medio de cultivo, comportamiento similar al observado en ambas cepas parentales.

Tabla V. 12. Crecimiento celular de las tetradas KE5-3 y KE5-17 en presencia de análogos tóxicos.

Cepas	Medio mínimo prolina más							
	Can	β -CA	NL	AzL	AzS	β -TA	Et	TFL
KE3-R23	S	S	R	R	S	S	S	S
MMY2/H3/LT1	S	S	R	R	R	R	R	R
3A	S	S	R	R	S	S	S	S
3B	S	S	R	R	S	S	S	S
3C	S	S	R	R	S	R	S	R
3D	S	S	R	R	R	R	R	R
17A	S	S	R	R	S	R	S	S
17B	S	S	R	R	S	S	S	S
17C	S	S	R	R	S	S	S	S
17D	S	S	R	R	R	R	R	R

(Can) L-canavanina 40 μ g/ml; (β -CA) β -cloroalanina 100 μ g/ml; (NL) D-norleucina 9,7 mM; (AzL) Azaleucina 50 μ g/ml; (AzS) Azaserina 50 μ g/ml; (β -TA) β -2-tienilalanina 100 μ g/ml; (Et) L-etionina 50 μ g/ml y (TFL) DL-trifluorleucina 100 μ M.

Las células crecieron durante 48 hs en medio mínimo sólido con prolina 10 mM como fuente de nitrógeno con las adiciones indicadas. El crecimiento de las células se comparó con el producido en medio MP sólido en ausencia de análogo tóxico. R: resistentes, S: sensibles.

Los análogos tóxicos de fenilalanina, metionina y serina: β -2-tienilalanina, L-etionina y azaserina, respectivamente, produjeron la inhibición del crecimiento en las cepas 3A, 3B, 17B y 17C, como el observado en la cepa parental KE3-R23. En contraste, las cepas 3D y 17D son completamente resistentes a estos análogos tóxicos como la cepa parental mutante MMY2/H3/LT1. Las segregantes que presentan

solamente actividad de transporte de L-leucina por el sistema S2 (3C y 17A) no crecen en presencia de etionina y azaserina, pero sí en presencia de β -2-tienilalanina. La resistencia al análogo tóxico de fenilalanina está ligada a la mutación *let1* y, por consiguiente, L-fenilalanina es transportada por el sistema S1 de alta afinidad.

Estos resultados, junto con los de los ensayos de competencia (L-metionina y L-fenilalanina inhiben el transporte de L-leucina por los sistemas S1 y S2, pero L-serina y L-treonina lo inhiben sólo por el sistema S2) y de crecimiento en placa con los aminoácidos como únicas fuentes de nitrógeno, indicarían que los productos de los genes *LET1* y *LET2* están involucrados en el transporte de metionina y fenilalanina. Además, el producto codificado por el gen *LET2* es necesario para el transporte de serina y treonina y, podría corresponder al sistema de baja afinidad detectado para el transporte de metionina descrito por Gits y Grenson (1967).

Si bien las cepas 3D y 17D son completamente resistentes a la presencia de etionina y azaserina en el medio de cultivo, el resto de las haploides analizadas fueron todas sensibles. Este resultado indicaría que son necesarias simultáneamente ambas mutaciones, *let1* y *let2*, para el desarrollo de la resistencia a estos análogos tóxicos o alternativamente, la presencia de una tercera mutación en adición de *let1* y *let2*.

V. 9. Conclusiones

En este capítulo se describe la caracterización de los sistemas de transporte de L-leucina en las cepas de las tetradas provenientes del cruce KE-3-R23 *gap1* x MMY2/H3/LT1 *gap1let1let2*. Se determinó que:

- la segregación de la actividad de transporte de L-leucina 1,0 mM (valores de velocidades iniciales y de incorporación), medida en células de cada tipo de tetrada crecidas en ambos medios mínimos MP y MA, difieren de lo esperado según la actividad y regulación observada en cada una de las cepas parentales y por el análisis de la segregación de la resistencia a TFL;

- en cada tetrada de diferente tipo se encuentran cepas con similar actividad de transporte de L-leucina en los dos medios mínimos, algunas de ellas comparable a la observada en la cepa parental mutante resistente a TFL y otras con una alta actividad de transporte de L-leucina en medio MA, siendo ésta entre 4 a 11 veces mayor que la observada en ambas cepas parentales;

- los valores del contenido intracelular de aminoácidos libres, se encuentran comprendidos entre los valores determinados para ambas cepas parentales;

- en la cepa KE5-3C (TFL^R) los altos valores de velocidad inicial, así como los de incorporación del aminoácido, en células crecidas en los dos medios mínimos, comparada con los obtenidos en ambas cepas parentales, no se deben a una reversión de la mutación *gap1*;

- es altamente improbable que proteínas del espacio periplasmático participen en el proceso de transporte de L-leucina, que justifiquen la diferente actividad de transporte del aminoácido en las haploides KE5- 3C y 3D, ambas TFL^R;

- la diferente actividad de transporte del aminoácido en las haploides KE5- 3C y 3D, ambas TFL^R, no se debe alteraciones en los sistemas productores de energía de la vía glucolítica. En ambas cepas el DNP inhibe el transporte de L-leucina 1,0 mM en 55-75%;

- mediante estudios cinéticos realizados en los tres tipos de tetradas se detectaron haploides con sistemas únicos de transporte de L-leucina: S1 de alta afinidad-baja velocidad; S2 de baja afinidad- alta velocidad y S2 de baja afinidad- baja velocidad. En otras haploides operan ambos sistemas de transporte S1 y S2;

- en los tres diferentes tipos de tetradas, el desarrollo de resistencia a TFL se correlaciona con la ausencia del sistema S1 de alta afinidad-baja velocidad (codificado por el gen *LET1*) y una segregación 2.2 del mismo.

- en los tres diferentes tipos de tetradas la segregación de la actividad de transporte de L-leucina por el sistema S2 de baja afinidad-alta velocidad, asignada al gen *LET2*, sugieren que el mismo no es el único componente involucrado en la óptima actividad de transporte por este sistema. Es sugerida una tercera mutación en la cepa MMY2/H3/LT1 en adición a *let1* y *let2*, de los sistemas S1 y S2;

- la inhibición diferencial producida por TFL en los valores de entrada de L-¹⁴C-leucina 0,05 mM, permite discriminar qué sistema está mediando el transporte del aminoácido;

- el transporte de L-leucina por ambos sistemas no es inhibido por aminoácidos con el grupo amino en posición distinta de α , tampoco por prolina, citrulina y cicloleucina;

- en la cepa KE5-17B, el transporte de L-leucina mediado sólo por el sistema S1, es inhibido significativamente por isoleucina, valina, metionina, fenilalanina, cisteína, homocisteína y por los análogos estructurales norvalina, norleucina, γ -metil-leucina y por el análogo tóxico TFL;

- en la cepa KE5-3C, el transporte de L-leucina mediado sólo por el sistema S2, es de amplia especificidad. Es inhibido significativamente (40-93%) por la mayoría de los aminoácidos analizados a excepción de los aminoácidos básicos y D-leucina que causaron una limitada inhibición (menor del 30%);

- el pH óptimo del sistema de transporte S1 se encuentra en el rango 5,5-6,0 y su actividad depende significativamente del pH externo;

- la relación entre pH externo / actividad de transporte de L-leucina por el sistema S2, depende de la capacidad del sistema y de la concentración de L-leucina analizada. La actividad de transporte de L-leucina 1,0 mM no se modifica significativamente en el rango de pH 3,5-6,0 y en estas condiciones no depende de la capacidad del sistema; a baja concentración externa del aminoácido, la actividad de transporte es óptima a pH 5,0-5,5 para el sistema S2 de alta capacidad y a pH 3,5-4,0 para el sistema S2 de baja capacidad;

- las observaciones realizadas en los ensayos de inhibición del transporte de L-leucina, mediado por sistemas únicos S1 o S2, se correlacionan con los ensayos de crecimiento en placa con aminoácidos como fuentes individuales de nitrógeno y en presencia de análogos tóxicos. La permeasa S1, codificada por el gen *LET1*, transporta los aminoácidos de cadena ramificada, metionina y fenilalanina pero no serina y treonina; una actividad óptima del sistema S2 es indispensable para el transporte de serina y treonina, y en el transporte de los aminoácidos de cadena ramificada, metionina, fenilalanina y norleucina y posterior utilización catabólica de los mismos como fuentes de nitrógeno.

**Sistemas transportadores de L-isoleucina y L-valina en las tetradas
obtenidas del cruce KE3-R23 x MMY2/H3/LT1**

	Página
VI. 1. Entrada e incorporación de L- ¹⁴ C-isoleucina y L- ¹⁴ C-valina	123
VI. 2. Especificidad de los sistemas transportadores de L-isoleucina y L-valina	130
VI. 3. Análisis cinético del transporte de L-isoleucina y L-valina	134
VI. 3. 1. Parámetros cinéticos del transporte de L-isoleucina	134
VI. 3. 2. Parámetros cinéticos del transporte de L-valina	137
VI. 4. Conclusiones	140

VI. Sistemas transportadores de L-isoleucina y L-valina en tetradas obtenidas del cruce KE-R23 x MMY2/H3/LT1.

VI. 1. Entrada e incorporación de L-¹⁴C-isoleucina y L-¹⁴C-valina

Para conocer el efecto de las mutaciones presentes en la cepa MMY2/H3/LT1 sobre el transporte de L-isoleucina y L-valina, se estudió la entrada e incorporación de ambos aminoácidos en tres tetradas provenientes del cruce de las cepas KE-R23 x MMY2/H3/LT1. Las tetradas seleccionadas fueron KE5-1, KE5-3 y KE5-17.

Los ensayos de entrada e incorporación de L-isoleucina y L-valina se realizaron a las concentraciones externas 0,05 y 1,0 mM de cada aminoácido, en células crecidas en los medios MP (Figuras VI.1 y VI. 2) , MA (Figuras VI. 3 y VI. 4) e YPD (Figura VI. 5).

Las concentraciones intracelulares de ambos aminoácidos, al finalizar las incubaciones, fueron siempre mayores que la concentración externa de los mismos, por lo tanto el proceso de transporte es concentrativo. Las excepciones fueron las cepas KE5-3D y KE5-17D, crecidas en los medios MP o MA donde las concentraciones intracelulares de los L-¹⁴C-aminoácidos acumulados fueron iguales o menores que la concentración externa 1,0 mM. A pesar de no ser concentrativo, el transporte de ambos aminoácidos en células de la cepa KE5-3D crecidas en medio MP, resultó inhibido por DNP. La inhibición en el transporte de L-isoleucina y L-valina fue del 30% y 50% respectivamente, a las dos concentraciones externas analizadas 0,05 y 1,0 mM.

Las Tablas VI. 1 y VI. 2 resumen las velocidades iniciales del transporte de L- isoleucina y L-valina, calculadas a partir de las pendientes de los trazados de las figuras precedentes. Se incluyen además para comparar los valores obtenidos para las cepas parentales KE3-R23 y MMY2/H3/LT1 (Tabla IV. 2).

En las Figuras VI. 1 - VI. 5 y las Tablas VI.1 - VI. 2 se observa que tanto en los medios MP como MA y en el medio complejo YPD, y a las dos concentraciones externas ensayadas de los aminoácidos, el patrón de segregación para el transporte de isoleucina y valina en las tetradas analizadas, coincide con el obtenido para el transporte de L-leucina y no corresponde a la segregación de un único gen mutado (relación 2:2), sino que es compatible con al menos dos genes mutados.

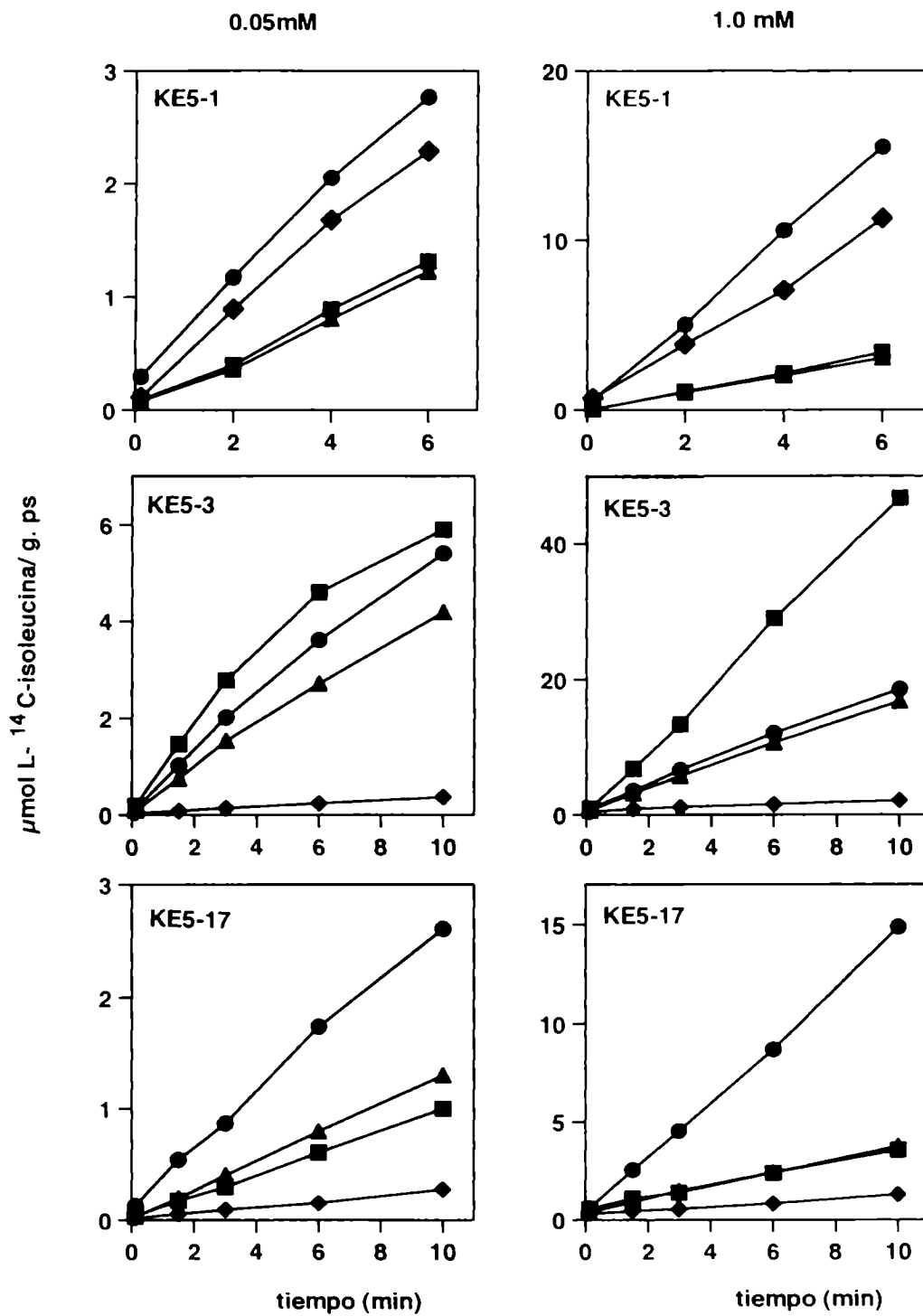


Figura VI. 1. Incorporación de L-¹⁴C-isoleucina 0,05 y 1,0 mM en células de las tetradas KE5-1, 3 y 17 crecidas en medio MP. A (●), B (▲), C (■) y D (◆).

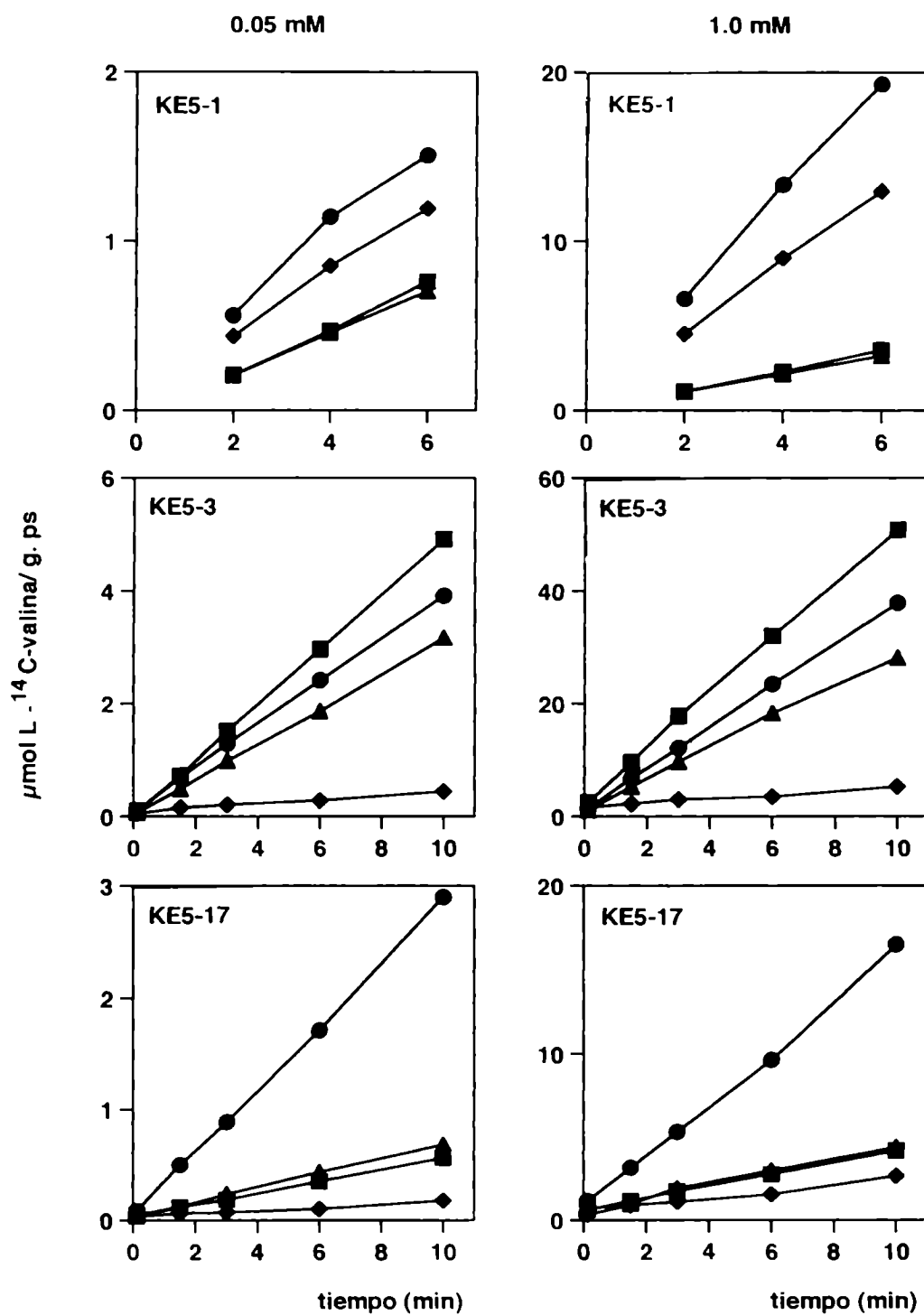


Figura VI. 2. Incorporación de L-¹⁴C-valina 0,05 y 1,0 mM en células de las tetradas KE5-1, 3 y 17 crecidas en medio MP. A (●), B (▲), C (■) y D (◆).

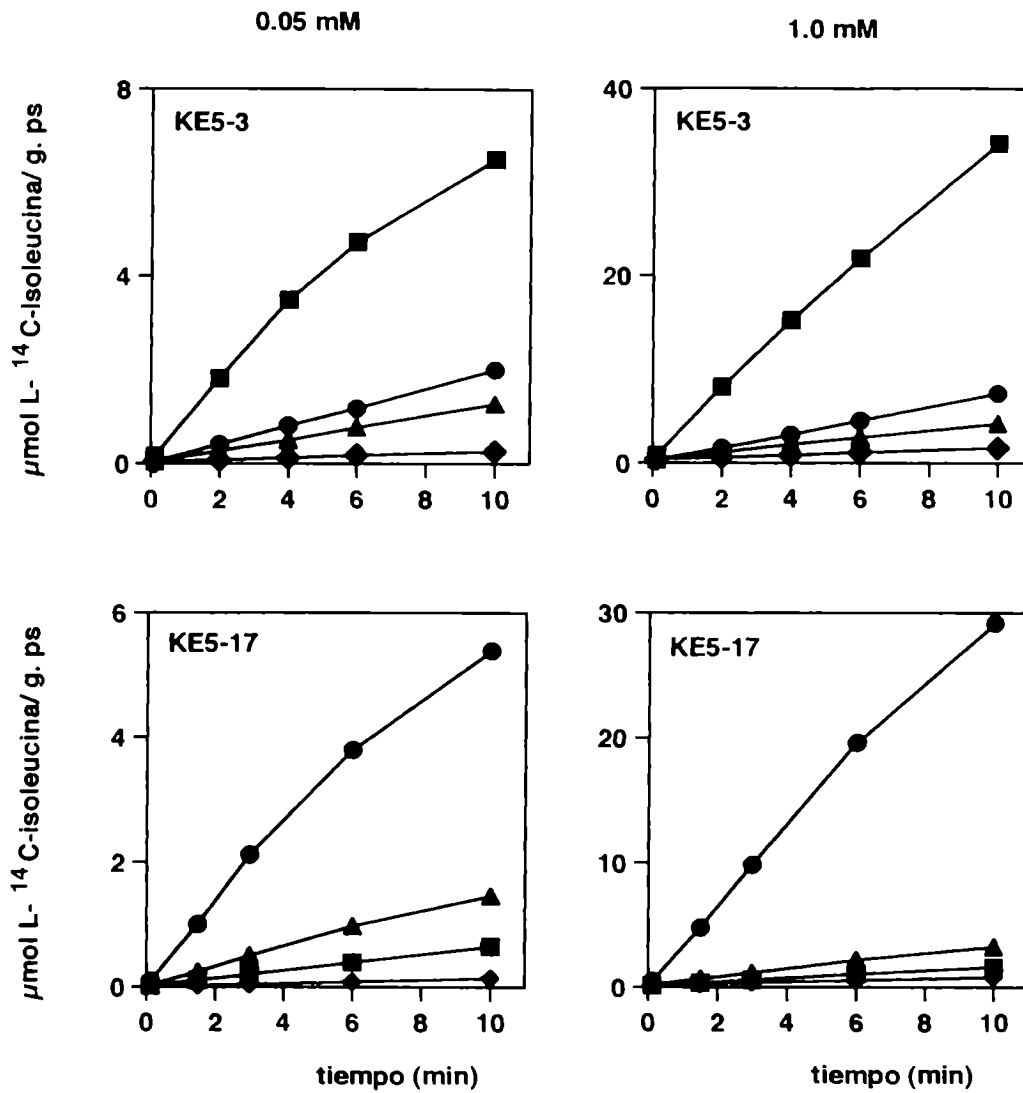


Figura VI. 3. Incorporación de L-¹⁴C-isoleucina 0,05 y 1,0 mM en células de las tetradas KE5-3 y 17 crecidas en medio MA. A (●), B (▲), C (■) y D (◆).

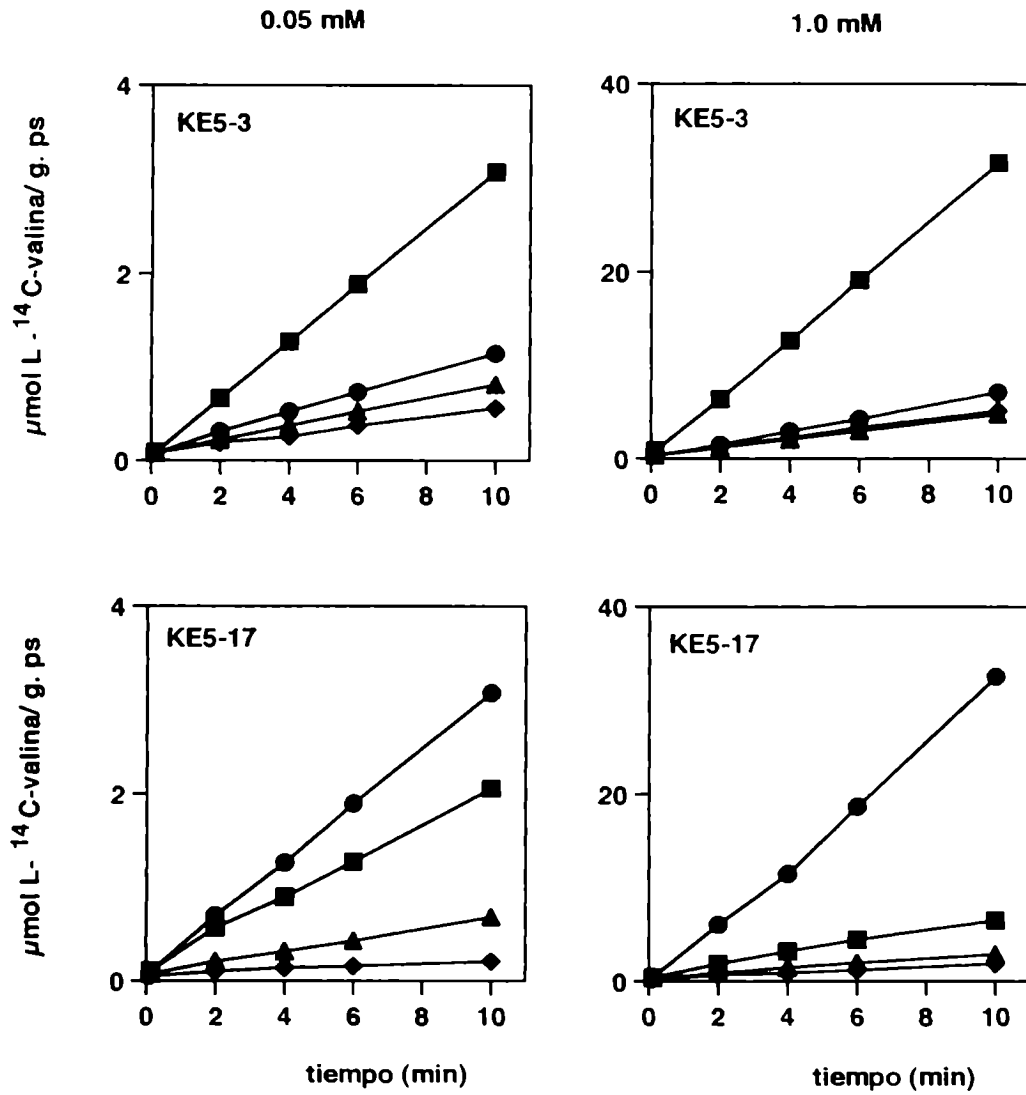


Figura VI. 4. Incorporación de L-¹⁴C-valina 0,05 y 1,0 mM en células de las tetradas KE5-3 y 17 crecidas en medio MA. A (●), B (▲), C (■) y D (◆).

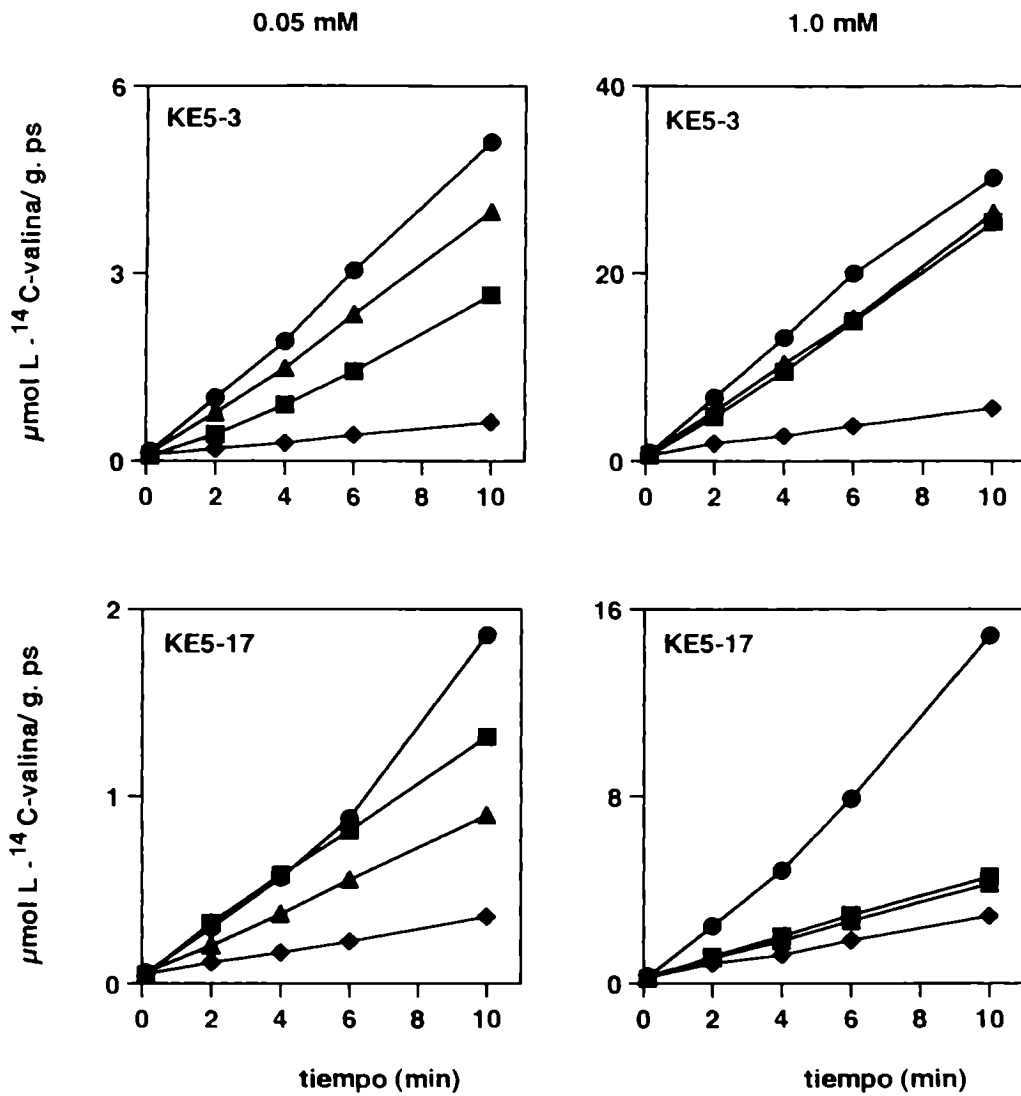


Figura VI. 5. Incorporación de L- ^{14}C -valina 0,05 y 1,0 mM en células de las tetradas KE5-3 y 17 crecidas en medio YPD. A (●), B (▲), C (■) y D (◆).

Tabla VI. 1. Efecto de la fuente de nitrógeno sobre el transporte de L-isoleucina

Cepas	v_i de transporte de L- ¹⁴ C-isoleucina			
	0,05 mM		1,0 mM	
	MP	MA	MP	MA
KE3-R23	0,51	0,11	2,15	0,35
MMY2/H3/LT1	0,09	0,02	0,44	0,10
KE5 -1A	0,40		2,62	
1B	0,22		0,51	
1C	0,25		0,58	
1D	0,39	-	1,86	-
KE5 -3A	0,60	0,20	1,98	0,67
3B	0,50	0,12	1,76	0,41
3C	0,90	0,86	5,93	3,72
3D	0,03	0,02	0,25	0,12
KE5 - 17A	0,26	0,71	1,36	3,25
17B	0,14	0,11	0,38	0,32
17C	0,09	0,06	0,30	0,16
17D	0,03	0,01	0,08	0,07

Tabla VI. 2. Efecto de la fuente de nitrógeno sobre el transporte de L-valina

Cepas	v_i de transporte de L- ¹⁴ C-valina					
	0,05 mM			1,0 mM		
	MP	MA	YPD	MP	MA	YPD
KE3-R23	0,24	0,10	0,26	1,38	0,84	1,41
MMY2/H3/LT1	0,06	0,03	0,04	0,31	0,25	0,32
KE5 -1A	0,24			3,19		
1B	0,13			0,53		
1C	0,14	-		0,61		
1D	0,19	-	-	2,11	-	-
KE5 -3A	0,41	0,12	0,46	3,73	0,68	3,15
3B	0,32	0,08	0,35	2,95	0,43	2,42
3C	0,50	0,31	0,21	5,31	3,05	2,29
3D	0,05	0,04	0,05	0,47	0,45	0,52
KE5 - 17A	0,28	0,30	0,13	1,45	2,83	1,17
17B	0,07	0,06	0,08	0,44	0,30	0,39
17C	0,05	0,20	0,14	0,39	0,73	0,47
17D	0,01	0,02	0,03	0,15	0,18	0,24

Las v_i ($\mu\text{mol min}^{-1} \text{g}^{-1}$) del transporte de L-isoleucina y L-valina, se calcularon a partir de las pendientes de los trazados de las Figuras VI. 1 - VI. 5.

Entonces, hay cepas con valores de v_i similares a cada una de las cepas parentales, otras con valores comprendidos entre los de éstas y haploides con capacidad de transporte de ambos aminoácidos aún mayores al de la parental KE3-R23, dependiendo estos valores tanto del medio de cultivo como de la concentración externa analizada. Por lo tanto las mutaciones *let1* y *let2* presentes en la cepa MMY2/H3/LT1 que afectan el transporte de leucina, también afectaron el transporte de isoleucina y valina.

Con respecto a la regulación del transporte de isoleucina y valina por la fuente de nitrógeno del medio de cultivo, se observa que las haploides 3A y 3B cultivadas en medio MA tienen entre 3,0 - 7,0 veces menor capacidad de transporte que en medio MP tal como ocurre en la cepa parental KE3-R23, estos resultados son similares a los hallados para el transporte de leucina. Otras cepas como 3C, 3D, 17B, 17C y 17D son poco afectadas en la actividad de transporte por crecimiento de las mismas en medio MA; mientras que la cepa 17A a diferencia de las demás, transporta aproximadamente el doble de L-isoleucina y L-valina en medio MA que en medio MP, siendo esta situación semejante a la observada para el transporte de L-leucina.

VI. 2. Especificidad de los sistemas transportadores de L-isoleucina y L-valina

Se estudió la especificidad del transporte de L-isoleucina en las cepas de las tetradas KE5-3 y KE5-17 y del transporte de L-valina en las cepas de la tetrada KE5-3 y en la segregante KE5-17B. Se determinaron los valores de entrada de los L-¹⁴C-aminoácidos a 3 minutos en presencia de diferentes aminoácidos no radiactivos. Los resultados se muestran en las Tablas VI. 3 - VI. 5.

En la tetrada KE5-3 (Tabla VI. 3), a baja concentración externa de L-¹⁴C-isoleucina, las cepas 3A y 3B presentan similares patrones de inhibición. Se obtuvo más del 50% de inhibición con isoleucina, metionina, leucina y treonina; valina sólo causó 40% de inhibición y alanina y trifluorleucina entre 28-37%. En contraste, el patrón de inhibición observado en la cepa 3C cambia, siendo significativo el efecto L-treonina y L-metionina sobre el transporte de L-¹⁴C-isoleucina con 67% y 62% de inhibición respectivamente, mientras que la inhibición por L-isoleucina fue del 63%. L-alanina, L-leucina y L-valina inhibieron entre 30-45%. El análogo tóxico trifluorleucina a diferencia de las cepas 3A y 3B no tiene ningún efecto significativo sobre el transporte de L-

isoleucina. La cepa 3D sigue el mismo patrón descrito para la cepa 3C pero con menores porcentajes de inhibición. Este hecho sugiere que las cepas 3C y 3D han perdido un sistema de alta afinidad de transporte de L-isoleucina, ya que además son resistentes a la inhibición del crecimiento en presencia del análogo tóxico. A concentración externa 1,0 mM de L-¹⁴C-isoleucina, se mantienen los perfiles de inhibición producidos por los distintos aminoácidos en cada una de las cepas estudiadas, pero con mayores porcentajes de inhibición.

Tabla VI. 3. Ensayo de inhibición del transporte de L-isoleucina en la tetrada KE5-3

Adiciones	L- ¹⁴ C-isoleucina externa							
	0,05 mM				1,0 mM			
	3A	3B	3C	3D	3A	3B	3C	3D
L-leucina	57	59	38	33	77	74	77	49
L-isoleucina	70	71	63	49	84	80	86	50
L-valina	40	41	30	22	65	61	65	40
L-alanina	31	33	44	33	72	68	80	57
L-metionina	64	62	62	43	82	77	86	52
L-treonina	52	54	67	52	78	78	87	64
DL-TFL	28	37	14	4	43	45	39	31
L-prolina	4	4	9	5	9	6	14	10

Las células crecieron en medio MP. Los valores controles luego de 3 min de incubación fueron 2,05; 1,59; 3,05 y 0,17 $\mu\text{mol L}^{-14}\text{C-isoleucina g}^{-1}$ para las cepas 3A, 3B, 3C y 3D respectivamente para la concentración de isoleucina externa 0,05 mM y de 6,63; 5,73; 16,72 y 1,16 $\mu\text{mol L}^{-14}\text{C-isoleucina g}^{-1}$ para las cepas 3A, 3B, 3C y 3D respectivamente para la concentración de isoleucina externa 1,0 mM. La concentración de los aminoácidos competidores es 10 veces la del aminoácido radiactivo. Los números representan % de inhibición de los controles.

En la tetrada KE5-17 (Tabla VI. 4), las cepas 17A y 17D presentan similares inhibiciones del transporte de L-¹⁴C-isoleucina a las observadas en las cepas 3C y 3D respectivamente. Las cepas 17B y 17C presentan los mismos perfiles de inhibición, pero éstos son muy diferentes a los de las cepas de la tetrada KE5-3. En este caso los inhibidores más efectivos del transporte de L-¹⁴C-isoleucina 0,05 mM son L-leucina

(79%), L-isoleucina (77-74%), L-metionina y DL- triflúorleucina (67-64%) y L-valina (58-56%). En cambio L-alanina y L-treonina producen menos del 20% de inhibición. Cuando el ensayo se realiza con 1,0 mM de L-¹⁴C-isoleucina externa se observa en general que los % de inhibición se mantienen excepto para L-alanina y L-treonina que se duplicaron.

Tabla VI. 4. Ensayo de inhibición del transporte de L-isoleucina en la tetrada KE5-17

Adiciones	L- ¹⁴ C-isoleucina externa							
	0,05 mM				1,0 mM			
	17A	17B	17C	17D	17A	17B	17C	17D
L-leucina	50	79	79	42	80	77	70	46
L-isoleucina	70	77	74	61	87	76	66	51
L-valina	36	58	56	36	65	65	60	29
L-alanina	43	14	10	35	75	35	30	55
L-metionina	65	67	64	54	86	66	67	54
L-treonina	64	18	16	48	86	35	33	61
DL-TFL	6	67	65	4	32	65	62	26
L-prolina	7	5	2	6	10	10	9	8

Las células crecieron en medio MP. Los valores controles luego de 3 min de incubación fueron 2,00; 0,58; 0,45 y 0,11 $\mu\text{mol L-}^{14}\text{C-isoleucina g}^{-1}$ para las cepas 17A, 17B, 17C y 17D respectivamente a la concentración de isoleucina externa 0,05 mM y de 8,16; 1,64; 1,38 y 0,68 $\mu\text{mol L-}^{14}\text{C-isoleucina g}^{-1}$ para las cepas 17A, 17B, 17C y 17D respectivamente a la concentración de isoleucina externa 1,0 mM. La concentración de los aminoácidos competidores es 10 veces la del aminoácido radiactivo. Los números representan % de inhibición de los controles.

El transporte de L-¹⁴C-valina en las cepas de la tetrada KE5-3 (Tabla VI. 5), se vió afectado en forma similar al de L-¹⁴C-isoleucina en presencia de los aminoácidos ensayados como competidores.

Para el transporte de L-¹⁴C-valina en la cepa KE5-17B se obtuvo el mismo patrón y similares porcentajes de inhibición que los observados cuando L-leucina o L-isoleucina

fueron los sustratos radiactivos. En esta cepa, el transporte de L-¹⁴C-valina es también inhibido (64%) por TFL y poco afectado por L-alanina y L-treonina (menos de 30%).

Tabla VI. 5. Ensayo de inhibición del transporte de L-valina en la tetrada KE5-3 y en la cepa KE5-17B.

adicionados	L- ¹⁴ C-valina externa									
	0,05 mM					1,0 mM				
	3A	3B	3C	3D	17B	3A	3B	3C	3D	17B
L-leucina	49	55	48	10	72	80	74	82	36	67
L-iso-leucina	58	66	66	24	67	82	80	89	38	69
L-valina	37	40	35	16	53	66	66	79	34	61
L-metionina	58	61	31	31	59	72	79	85	44	63
L-prolina	0	0	10	5	8	9	0	29	29	2

Las células crecieron en medio MP. Los valores controles luego de 3 min de incubación fueron 0,92, 0,79; 1,36; 0,16 y 0,24 $\mu\text{mol L}^{-14}\text{C-valina g}^{-1}$ para las cepas 3A, 3B, 3C, 3D y 17B respectivamente a la concentración de valina externa 0,05 mM y de 8,71; 6,81; 17,77; 2,30 y 1,32 $\mu\text{mol L}^{-14}\text{C-valina g}^{-1}$ para las cepas 3A, 3B, 3C, 3D y 17B respectivamente a la concentración de valina externa 1,0 mM. Los números representan % de inhibición de los controles.

En las cepas KE5-17 B y 17C el efecto diferencial de TFL por una parte y de L-alanina y L-treonina por otra, puede interpretarse si estas cepas, poseen un sistema de alta afinidad para el transporte de L-iso-leucina y L-valina, inhibible por TFL y de especificidad restringida para los aminoácidos de cadena ramificada y la ausencia de otro sistema de transporte de L-iso-leucina y L-valina, de menor afinidad, que es inhibido significativamente por L-alanina y L-treonina.

La baja actividad de transporte de L-iso-leucina y L-valina observada en las cepas 17B y 17C, junto con la inhibición del crecimiento en medios mínimos en presencia de TFL (Tabla V. 12) y el hecho de que ambas cepas no puedan utilizar L-serina y L-treonina como fuentes de nitrógeno en medios de cultivo (Tabla V. 11), apoyan esta interpretación.

VI . 3 . Análisis cinético del transporte de L-iso-leucina y L-valina

Los parámetros cinéticos del transporte de L-iso-leucina y L-valina se determinaron en las cepas de la tetrada KE5-3 y de la tetrada KE5-17 se seleccionó la cepa KE5-17B debido a que como se vió en el Capítulo V. 5 presenta un único sistema de transporte de L-leucina de alta afinidad. Teniendo en cuenta los resultados de incorporación de ambos aminoácidos, se eligió el medio mínimo con L-prolina como fuente de nitrógeno para el crecimiento de las células. En estas condiciones las cepas estudiadas desarrollaron la máxima actividad de transporte.

VI. 3. 1. Parámetros cinéticos del transporte de L-iso-leucina

Los parámetros cinéticos para el transporte de L-iso-leucina, calculados a partir de las representaciones de los datos experimentales (Figuras VI. 6 y VI. 7) se presentan en la Tabla VI. 6.

Tabla VI. 6. Parámetros cinéticos del transporte de L-iso-leucina

Cepas	K_T (μM)	$J_{\text{máx}}$ ($\mu\text{mol min}^{-1} \text{g}^{-1}$)
KE3-R23	207	2,32
MMY2/H3/LT1	239	0,41
3A	136	1,86
3B	125	1,48
3C	325	7,53
3D	239	0,18
17B	55	0,45

Los valores de los parámetros cinéticos se calcularon a partir de las representaciones de Lineweaver-Burk de las Figuras VI. 6 y VI. 7.

En el rango de concentraciones de L-iso-leucina analizadas, las representaciones de dobles recíprocas del transporte de L-iso-leucina fueron lineales en todos los casos (Figuras VI. 6 y VI. 7). Estos resultados indican que se puede caracterizar cinéticamente un único sistema de transporte de L-iso-leucina en cada una de estas cepas, aunque difieren tanto en los valores de K_T como de $J_{\text{máx}}$.

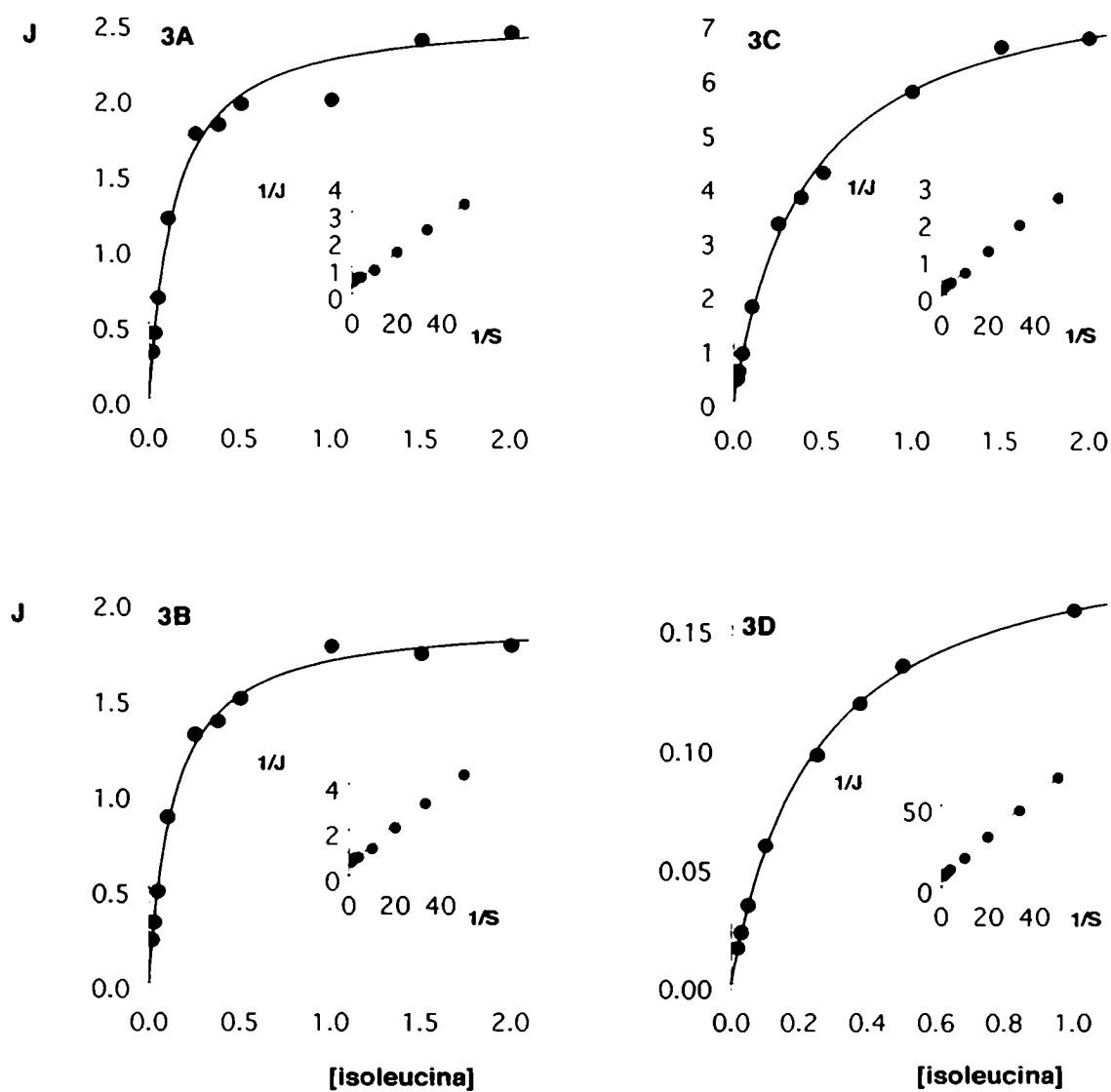


Figura VI. 6. Cinética de transporte de L-isoleucina en células de la tetrada KE5-3 crecidas en medio MP.

Inset: representación de Lineweaver-Burk.

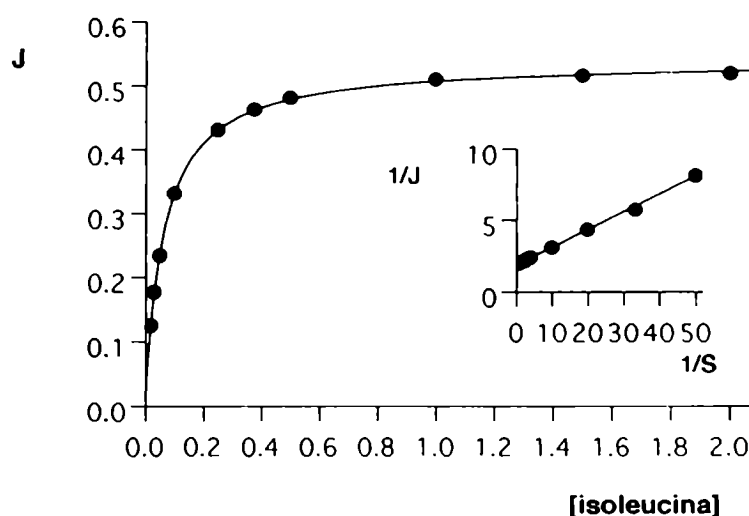


Figura VI. 7. Cinética de transporte de L-isoleucina en células de la cepa KE5-17B crecidas en medio MP.

Inset: representación de Lineweaver-Burk

En la cepa 3D se observó que a partir de la concentración 1,0 mM las velocidades iniciales de transporte de isoleucina aumentan en forma proporcional con el aumento de la concentración externa (no mostrada en la Figura VI. 6D). La representación de Eadie-Hofstee de los valores produjo un gráfico con dos componentes lineales, siendo estos resultados compatibles con la presencia de dos sistemas de transporte de isoleucina o de un único sistema de transporte más un componente de difusión: uno de los sistemas es el descrito en la Tabla VI. 6 y el otro con muy alto K_T (2,08 mM) o $D = 0,067 \mu\text{mol min}^{-1}\text{g}^{-1} \text{mM}^{-1}$.

En las cepas de las tetradas, todas las constantes de afinidad calculadas difieren entre sí en menos de un orden de magnitud, por lo tanto si el transporte de L-isoleucina ocurre a través de más de un sistema se hace muy difícil poderlos diferenciar cinéticamente. Por otra parte comparando estos valores con los obtenidos para las cepas parentales también difieren en menos de un orden de magnitud.

Teniendo en cuenta los valores de K_T para el transporte de L-isoleucina en las cepas 3C y 3D y que en la cepa 17B, se detecta un único sistema de transporte de alta afinidad y baja capacidad, es razonable proponer que en las cepas 3A y 3B y en las mutantes *gap1* el transporte del aminoácido se efectúe a través de más de un sistema.

En la cepa 3C si bien la afinidad para el transporte de isoleucina disminuye con respecto a las calculadas en las cepas parentales, el $J_{m\acute{a}x}$ se incrementa 3,5 veces con respecto a la cepa KE3-R23, como si la pérdida de afinidad fuera compensada por un aumento en el $J_{m\acute{a}x}$, siendo estos resultados similares a los observados para el transporte de leucina.

VI. 3. 2. Parámetros cinéticos del transporte de L-valina

Las Figuras VI. 8 y VI. 9 muestran la entrada de L-¹⁴C-valina en función de su concentración externa en las cepas analizadas. Los parámetros cinéticos se presentan en la Tabla VI. 7.

Tabla VI. 7. Parámetros cinéticos del transporte de L-valina

Cepas	K_T (mM)	$J_{m\acute{a}x}$ ($\mu\text{mol min}^{-1} \text{g}^{-1}$)	D $\mu\text{mol min}^{-1} \text{g}^{-1} \text{mM}^{-1}$
KE3-R23	0,38	2,17	
MMY2/H3/LT1	0,38	0,46	
3A	1: 0,13 2: 0,82	0,97 4,38	-
3B	1: 0,13 2: 0,75	0,63 2,53	
3C	0,45	2,47	1,83
3D	0,57	0,68	0,45
17B	0,08	0,20	

Los valores de los parámetros cinéticos se calcularon a partir de las representaciones de las Figuras VI. 8 y VI. 9. D es la constante de difusión.

En las cepas 3A y 3B, las representaciones de Lineweaver-Burk de los datos, se ajustan a un componente lineal, con valores de K_T : 0,39 y 0,33 mM y de $J_{m\acute{a}x}$: 2,71 y 1,44 $\mu\text{mol min}^{-1} \text{g}^{-1}$, respectivamente, similares a los obtenidos en las cepas *gap1*. Sin embargo, como se observa en la Figura VI. 8, el sistema de transporte de L-valina no parece saturarse con ese valor de $J_{m\acute{a}x}$.

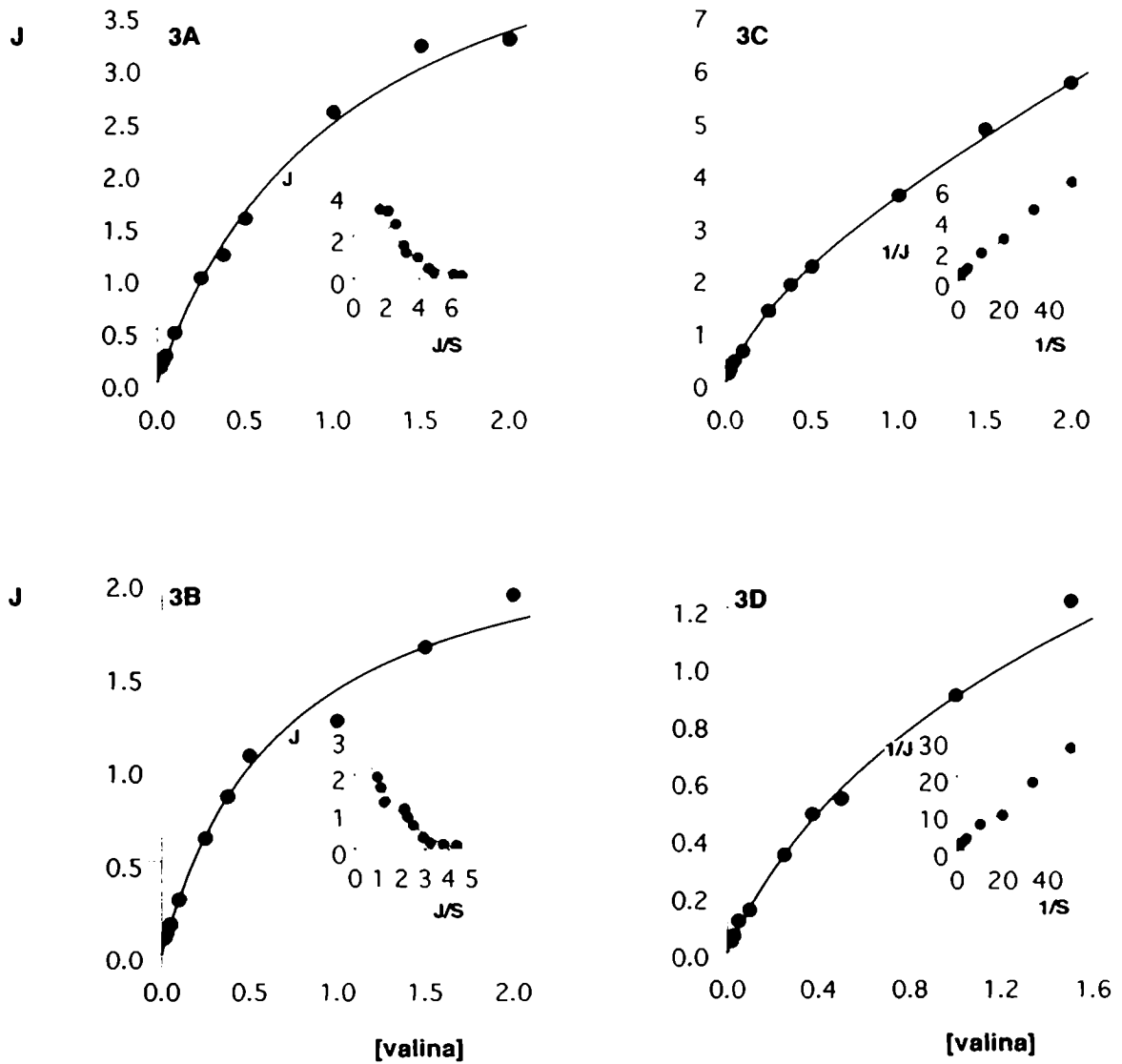


Figura VI. 8. Cinética de transporte de L-valina en células de la tetrada KE5-3 crecidas en medio MP.

Inset: 3C y 3D representación de Lineweaver-Burk

3A y 3B representación de Eadie-Hofstee

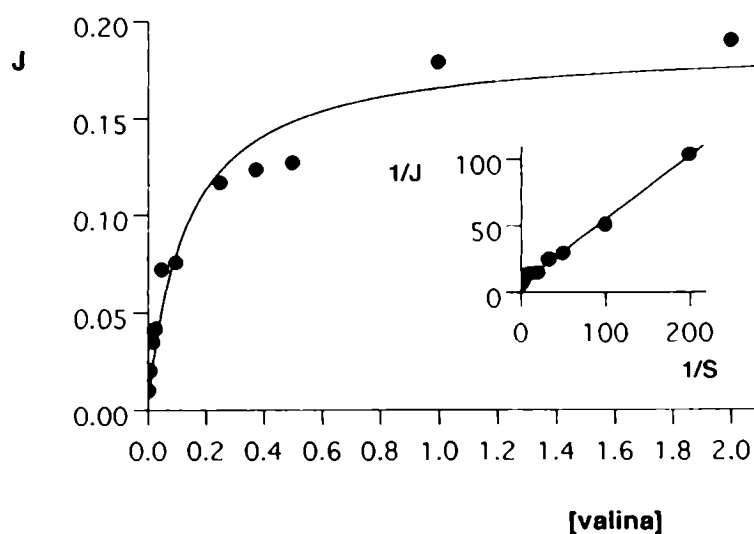


Figura VI. 9. Cinética de transporte de L-valina en células de la tetrada KE5-17B crecidas en medio MP.

Inset: representación de Lineweaver-Burk

La representación de Eadie-Hofstee, permitió detectar dos componentes lineales para el transporte de L-valina en cada cepa, compatibles con la presencia de dos sistemas de transporte del aminoácido: uno de alta afinidad - baja velocidad y el otro de baja afinidad - alta velocidad, caracterizados por los parámetros cinéticos indicados en la Tabla VI. 7. Si bien en las cepas *gap1* KE3-R23 y MMY2/H3 los datos cinéticos también fueron analizados según Eadie-Hofstee, no se detectó el sistema de alta afinidad, quedando probablemente enmascarado por el otro sistema. Los resultados obtenidos en la cepa 17B, identificando un componente de alta afinidad - baja velocidad (Figura VI. 9), confirman la presencia de este sistema en las cepas 3A y 3B, indicando que el transporte de L-valina es mediado por más de un sistema en las mutantes *gap1*.

En las cepas 3C y 3D, el ajuste de los datos cinéticos indica que el transporte de L-valina es mediado por un sistema de baja afinidad aunque de diferente capacidad y un componente de difusión, ya que el sistema no tiende a la saturación.

En cada una de las cepas analizadas, los tres aminoácidos de cadena ramificada presentan comportamientos cinéticos semejantes.

VI. 4. Conclusiones

En este capítulo se caracterizan los sistemas transportadores de L-isoleucina y L-valina, en las cepas de las tetradas provenientes del cruce KE3-R23 *gap1* x MMY2/H-3/LT1 *gap1let1let2*. Se determinó que:

- el transporte de ambos aminoácidos es concentrativo en los tres medios analizados; las excepciones corresponden a las células de las cepas 3D y 17D crecidas en los dos medios mínimos, en las cuales el transporte de isoleucina y valina 1,0 no es concentrativo, aún así el transporte resultó inhibido por DNP en 30-50%;

- el patrón de segregación del transporte de ambos aminoácidos en las cepas, es similar al encontrado para el transporte de L-leucina, por ejemplo comparadas con las cepas parentales: muy alta actividad de transporte en los dos medios mínimos (cepa 3C), mayor actividad de transporte en medio MA que en medio MP (cepa 17A), actividad de transporte similar en los medio MP y MA (cepas 3D, 17B, 17C y 17D) y cepas con actividad de transporte mayor en medio MP que en medio MA (cepas 3A y 3B);

- al menos dos genes afectaron la actividad total de transporte de L-isoleucina y valina y son los que afectan el transporte de L-leucina en la mutante resistente a TFL: *LET1* y *LET2*;

- en las cepas de la tetrada KE5-3, el transporte de isoleucina y valina resulta significativamente inhibido por leucina, isoleucina, valina, treonina, metionina y alanina; el transporte de L-isoleucina y L-valina no es inhibido por L-prolina, a excepción del transporte de valina 1,0 mM en las cepas 3C y 3D que es inhibido un 30%; en estas dos cepas el transporte de isoleucina 0,05 mM no es inhibido por TFL;

- el patrón de inhibición del transporte de isoleucina en las cepas 17A y 17D, es similar al observado en las cepas 3C y 3D, respectivamente; las cepas 17B y 17C presentan los mismos perfiles de inhibición, pero éstos son diferentes a los de las cepas de la tetrada KE5-3: el transporte de isoleucina 0,05 mM es inhibido en más del 60% por los aminoácidos de cadena ramificada, metionina y TFL, alanina y treonina produjeron menos del 20% de inhibición; la inhibición del transporte de L-valina en la cepa 17B es similar a la descrita para el transporte de L-isoleucina;

- en cada una de las cepas analizadas se caracteriza cinéticamente solamente un sistema de transporte de L-isoleucina pero que difieren tanto en los valores de K_T como de $J_{m\acute{a}x}$:

-los parámetros cinéticos del transporte de isoleucina en la cepa 17B ($K_T = 55 \mu\text{M}$ y $J_{m\acute{a}x} = 0,45 \mu\text{mol min}^{-1} \text{g}^{-1}$) indican la presencia de un sistema de alta afinidad-baja velocidad y los calculados para el transporte del aminoácido en la cepa 3C ($K_T = 325 \mu\text{M}$ y $J_{m\acute{a}x} = 7,53 \mu\text{mol min}^{-1} \text{g}^{-1}$) indican la presencia de otro sistema de baja afinidad-alta velocidad; en la cepa 3D se caracteriza cinéticamente un sistema de baja afinidad-baja velocidad ($K_T = 0,24 \text{mM}$ y $J_{m\acute{a}x} = 0,41 \mu\text{mol min}^{-1} \text{g}^{-1}$) con similares valores de parámetros cinéticos a los descritos en la cepa parental mutante MMY2/H3/LT1;

- el transporte de L-isoleucina en las cepas 3A, 3B y en las mutantes *gap1* KE3-R23 y MMY2/H3, es mediado por al menos dos sistemas que no pueden diferenciarse cinéticamente en estas cepas;

- el transporte de L-valina es mediado por dos sistemas en las cepas 3A y 3B: un sistema de alta afinidad- baja capacidad ($K_T = 130 \mu\text{M}$ y $J_{m\acute{a}x} = 0,63\text{-}0,97 \mu\text{mol min}^{-1} \text{g}^{-1}$) y otro sistema de baja afinidad- alta capacidad ($K_T = 130 \mu\text{M}$ y $J_{m\acute{a}x} = 2,53\text{-}4,38 \mu\text{mol min}^{-1} \text{g}^{-1}$); en la cepa 17B solamente un sistema de alta afinidad- baja capacidad ($K_T = 81 \mu\text{M}$ y $J_{m\acute{a}x} = 0,20 \mu\text{mol min}^{-1} \text{g}^{-1}$) media el transporte de L-valina, siendo éste el detectado en las cepas 3A y 3B; en las cepas 3C y 3D el transporte de L-valina es mediado por un sistema de baja afinidad pero de diferente capacidad ($K_T = 0,45\text{-}0,57 \text{mM}$ y $J_{m\acute{a}x} = 2,47$ y $0,68 \mu\text{mol min}^{-1} \text{g}^{-1}$, respectivamente) más un componente de difusión;

- el transporte de L-valina en las cepas 3A, 3B y en las mutantes *gap1* KE3-R23 y MMY2/H3, es mediado por al menos dos sistemas, éstos no pueden diferenciarse cinéticamente en las mutantes *gap1*;

- el gen *LET1*, codifica el sistema de alta afinidad-baja velocidad (S1) de transporte de los aminoácidos de cadena ramificada;

- el gen *LET2*, codifica un factor indispensable para la óptima actividad del sistema baja afinidad-alta velocidad (S2) de transporte de los aminoácidos de cadena ramificada;

**Relaciones entre los sistemas de transporte de
L-leucina, L-isoleucina y L-valina**

	Página
VII. 1. Cinéticas de inhibición	142
VII. 1. 1. Tipo de inhibición por los aminoácidos de cadena ramificada sobre sus transportes en la cepa KE5-17B	142
VII. 1. 2. Tipo de inhibición por varios aminoácidos sobre el transporte de L-leucina en la cepa KE5-3C	146
VII. 2. Regulación de la actividad de los sistemas S1 y S2	148
VII. 2. 1. Transporte de L-leucina en células precargadas con aminoácidos	148
VII. 2. 2. Efecto de la fuente de nitrógeno sobre el transporte de los aminoácidos de cadena ramificada	150
VII. 3. Conclusiones	153

VII. Relaciones entre los sistemas de transporte de L-leucina, L-isoleucina y L-valina

En la cepa KE5-17B, los ensayos de competencia mostraron que los patrones de inhibición del transporte L-isoleucina y L-valina, fueron casi idénticos a los encontrados para el transporte de L-leucina. Cada uno de los aminoácidos de cadena ramificada (utilizado como sustrato o inhibidor) inhibe el transporte de los otros dos. Además, en esta cepa, la caracterización cinética del transporte de leucina, isoleucina y valina, indicó la presencia de sistemas únicos, de alta afinidad y baja velocidad. Estos resultados sugieren que los tres aminoácidos, son transportados por una misma permeasa, el sistema denominado S1 para el transporte de L-leucina. Se estudió también la regulación del sistema S1, por la fuente de nitrógeno presente en el medio de cultivo y en diferentes condiciones experimentales.

Las mismas consideraciones, pueden aplicarse para el transporte de los aminoácidos de cadena ramificada en la cepa KE5-3C, pero con baja afinidad y alta capacidad, indicando que los mismos son transportados por el sistema denominado S2 para el transporte de L-leucina.

Los experimentos realizados a continuación, tuvieron el objeto de establecer las relaciones entre los sistemas de transporte de cada uno de los tres aminoácidos y su regulación.

VII. 1. Cinéticas de inhibición

VII. 1. 1. Tipo de inhibición por los aminoácidos de cadena ramificada sobre sus transportes en la cepa KE5-17B

Se estudió el tipo de inhibición producida por isoleucina y valina sobre el transporte de leucina. Estos aminoácidos en concentración 0,5 mM, causaron 71 y 53% de inhibición, respectivamente, sobre la entrada de L-¹⁴C-leucina 0,05 mM (Tabla V. 6). Los resultados de la Figura VII. 1 indican que los mismos, son inhibidores competitivos del transporte de L-leucina. El mismo estudio se realizó para el transporte de isoleucina y valina, utilizando los otros aminoácidos de cadena ramificada como inhibidores. Los resultados de las Figuras VII. 2 y VII. 3 indican que las inhibiciones recíprocas fueron competitivas en todas las combinaciones.

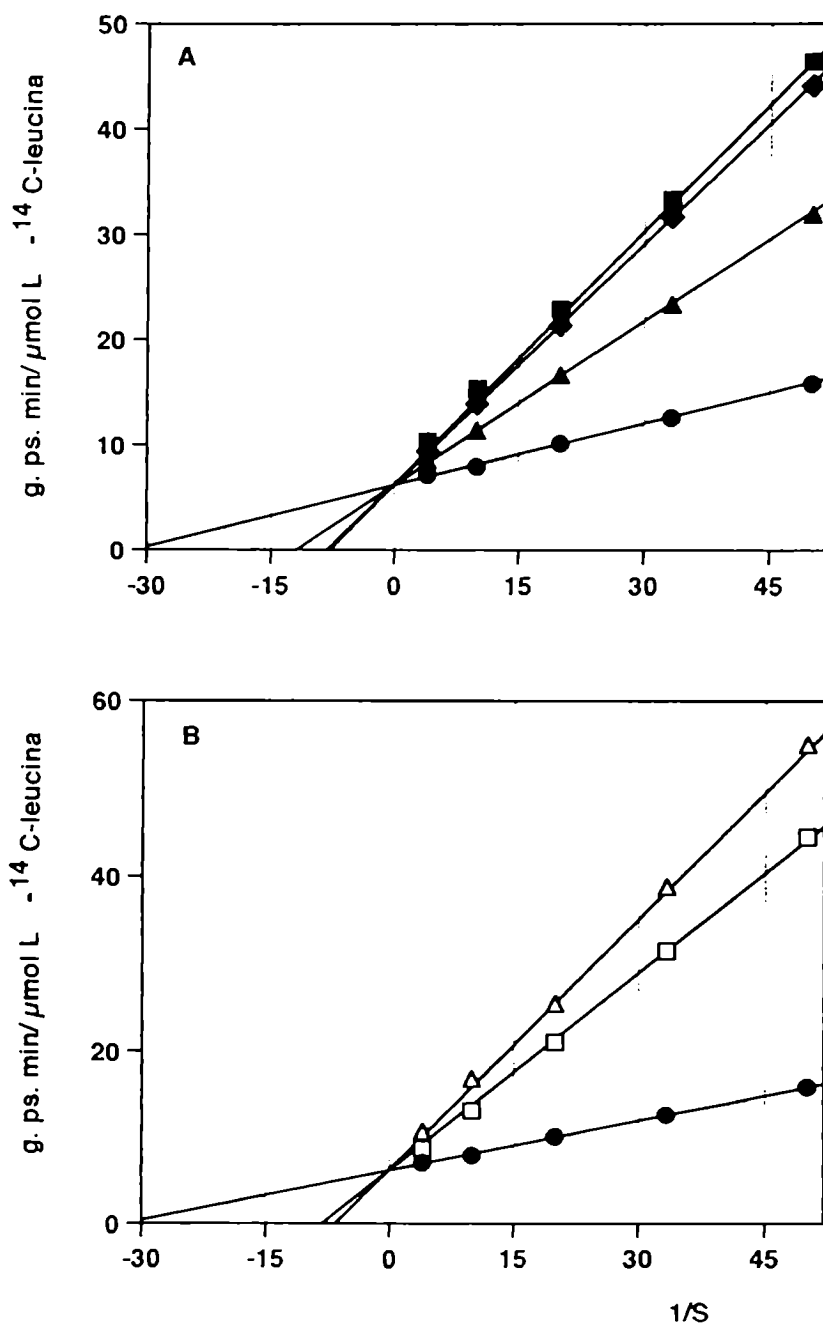


Figura VII. 1. Cinética de inhibición del transporte de L-¹⁴C-leucina por L-aminoácidos y análogos de aminoácidos en células de la cepa KE5-17B crecidas en medio MP. Representación de Lineweaver-Burk mostrando la inhibición competitiva del transporte de L-leucina (●) por **A.** L-isoleucina 0,10 mM (▲); L-valina 0,25 mM (■) y L- metionina 0.25 mM (◆). **B.** L-norleucina 0,25 mM (▲) y DL-TFL 0,25 mM (□).

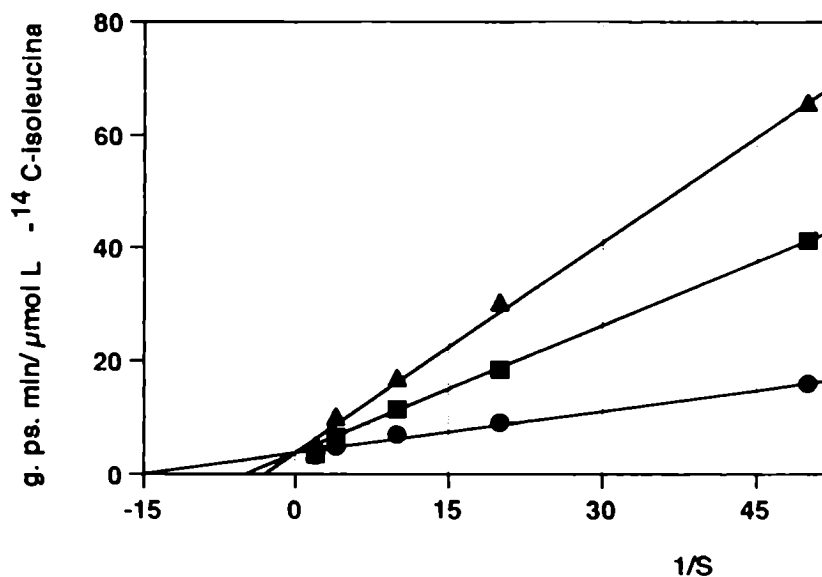


Figura VII. 2. Cinética de inhibición del transporte de L-¹⁴C-isoleucina(●) por L-leucina 0,10 mM (▲) y L-valina 0,25 mM (■) en la cepa KE5-17B. Representación de Lineweaver-Burk mostrando la inhibición competitiva del transporte de L-¹⁴C-isoleucina.

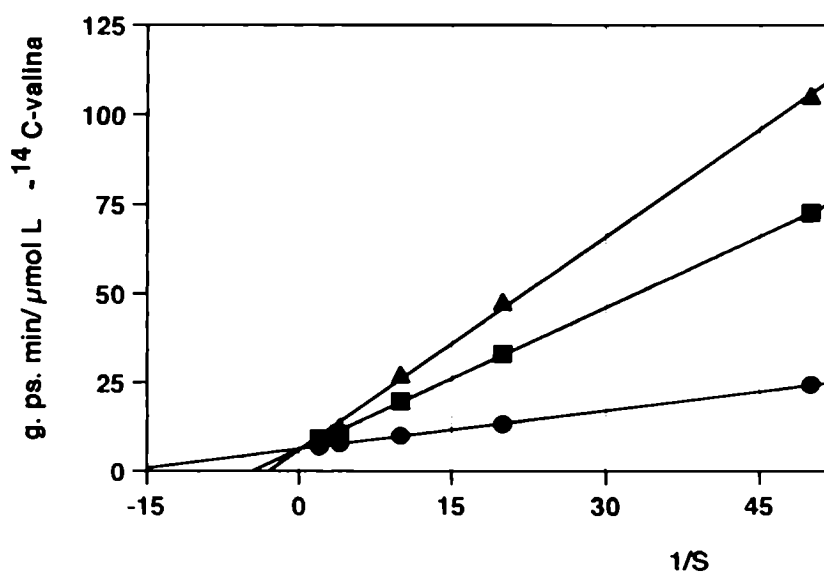


Figura VII. 3. Cinética de inhibición del transporte de L-¹⁴C-valina(●) por L-leucina 0,10 mM (▲) y L-isoleucina 0,10 mM (■) en la cepa KE5-17B. Representación de Lineweaver-Burk mostrando la inhibición competitiva del transporte de L-¹⁴C-valina.

En la Tabla VII. 1 se muestran los valores de K_T y K_i determinados para L-leucina, L-isoleucina y L-valina. Los valores calculados de K_T y K_i para cada aminoácido de cadena ramificada en particular (tomado como sustrato y como inhibidor, respectivamente), son muy similares. En la Figura VII. 1 también se muestra que metionina, norleucina y trifluorleucina son inhibidores competitivos del transporte de leucina, con valores de $K_{i,met} = 80 \mu\text{M}$, $K_{i,norleu} = 60 \mu\text{M}$ y $K_{i,TFL} = 85 \mu\text{M}$. Si dos aminoácidos utilizan el mismo sitio de transporte para ingresar a las células, cada uno de ellos puede inhibir la entrada del otro competitivamente, con una constante de inhibición igual a la constante de afinidad medida para su propio transporte. Por el contrario, si las constantes son diferentes, nos está indicando la presencia de dos sitios activos distintos.

Tabla VII. 1. Valores de K_T y K_i para el transporte de los aminoácidos de cadena ramificada

Aminoácido	K_T (μM)	K_i (μM)		
		L-leucina	L-isoleucina	L-valina
L-leucina	27		52	84
L-isoleucina	48	22		103
L-valina	80	24	41	

Las determinaciones se realizaron en células de la cepa KE5-17B crecidas en medio MP. Las constantes fueron determinadas a partir de los datos experimentales de las Figuras VII. 1 - VII. 3. Las constantes de inhibición se calcularon a partir de la fórmula $K_i = i / [(K_a / K_T) - 1]$, donde i es la concentración de inhibidor y K_a la K_T aparente en presencia de inhibidor.

Teniendo en cuenta estos criterios, los resultados de las Figuras VII. 1- VII. 3, y de la Tabla VII. 1 indican que los aminoácidos de cadena ramificada, son transportados por una permeasa común en la cepa KE5-17B, y que la misma corresponde al sistema S1. En el caso de trifluorleucina, su transporte también es mediado por S1, debido a que la pérdida del sistema de alta afinidad está ligada a la resistencia a TFL en la cepa mutante MMY2/H3/LT1 (Tabla III. 7).

VII. 1. 2. Tipo de inhibición por varios aminoácidos sobre el transporte de L-leucina en la cepa KE5-3C

Se determinaron los parámetros cinéticos del transporte de L-¹⁴C-leucina (0,05-2,0 mM), en presencia L-isoleucina, L-valina, L-metionina, L-norleucina y DL-TFL. Los primeros cuatro aminoácidos a concentración 10 mM, inhibieron el transporte de L-leucina 1,0 mM entre el 70-95%, mientras que la inhibición por TFL fue del 40%.

Los aminoácidos analizados fueron inhibidores competitivos del transporte de L-leucina por el sistema de baja afinidad y alta capacidad, S₂, tal como se observa en la Figura VII. 4.

Los valores de las K_i se presentan en la Tabla VII. 2. Puede observarse en la misma que, excepto el valor de K_i por TFL, que es mucho más grande que el valor de K_T (0,32 mM) de L-leucina por el sistema S₂, los demás aminoácidos competidores presentan valores de K_i cercanos o aún menores que el valor de K_T de L-leucina. L-alanina también inhibió competitivamente ($K_i = 0,93$ mM) el transporte de L-leucina por el sistema S₂ en la cepa KE5-3A, que exhibe los dos sistemas de transporte de L-leucina.

Tabla VII. 2. Constantes de inhibición del transporte de L-leucina en la cepa KE5-3C

Aminoácidos	K_i (mM)
L-isoleucina	0,25
L-valina	0,44
L-metionina	0,29
L-norleucina	0,16
DL-TFL	4,44

Las determinaciones se realizaron en células de la cepa KE5-3C crecidas en medio MP. Las constantes de inhibición fueron determinadas a partir de los datos experimentales de las Figuras VII. 4 utilizando la fórmula de la leyenda de la Tabla VII. 1.

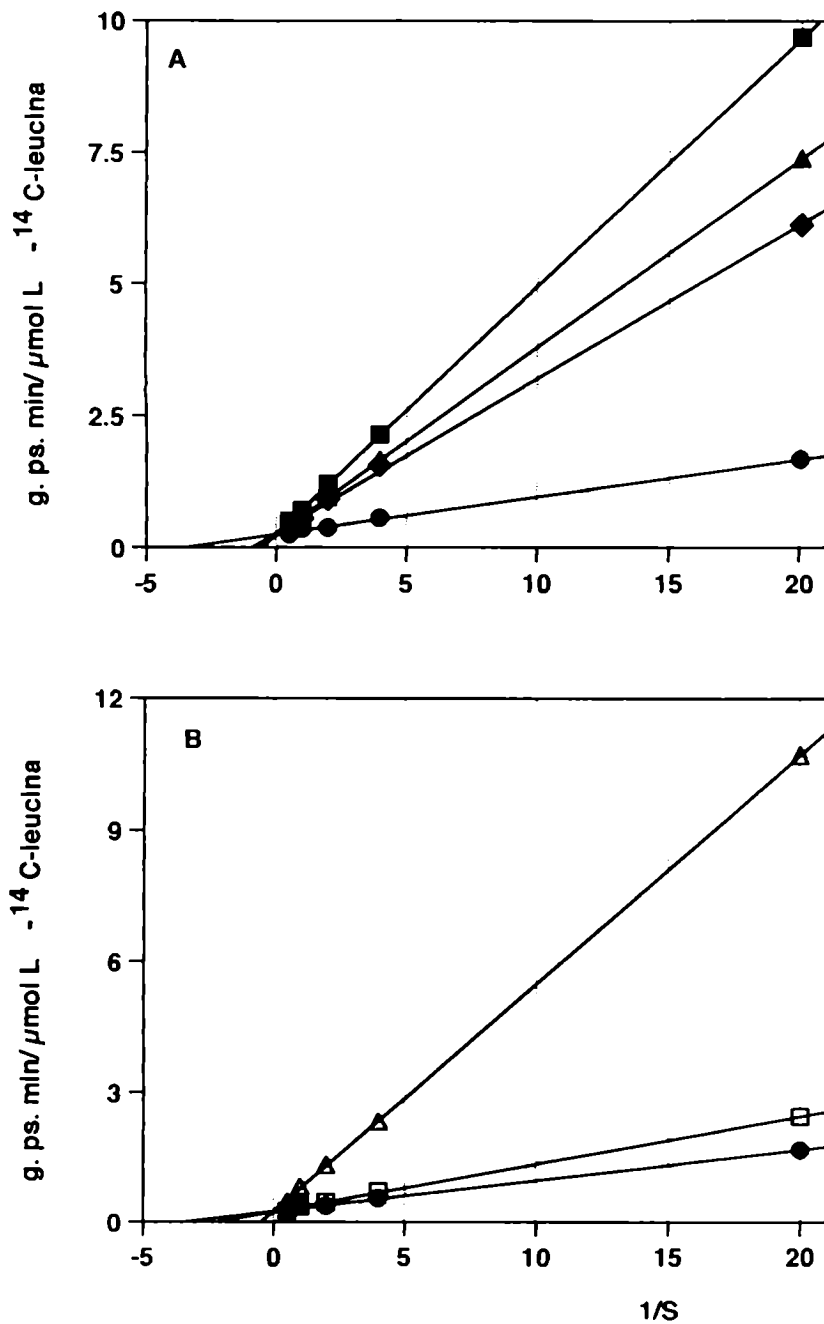


Figura VII. 4. Cinética de inhibición del transporte de L-¹⁴C-leucina por L-aminoácidos y análogos en células de la cepa KE5-3C crecidas en medio MP. Representación de Lineweaver-Burk mostrando la inhibición competitiva del transporte de L-leucina (●) por A. L-isoleucina 1,0 mM (▲); L-valina 2,5 mM (■) y L-metionina 1,0 mM (◆). B. L-norleucina 1,0 mM (▲) y DL-TFL 2,5 mM (□).

VII. 2. Regulación de la actividad de los sistemas S1 y S2

VII. 2. 1. Transporte de L-leucina en células crecidas en presencia de aminoácidos

Las actividades de las permeasas de aminoácidos en *S. cerevisiae* están sujetas a un mecanismo de retroinhibición, ejercida por sus sustratos acumulados intracelularmente (Wiame y col., 1985). Otro mecanismo de regulación es la transinhibición, observada para la permeasa específica de L-prolina, ejercida por aminoácidos que no son sustratos de este sistema (Horák y Rihová, 1982).

Teniendo en cuenta los resultados de los investigadores mencionados, se decidió estudiar el efecto de varios aminoácidos durante el crecimiento celular sobre el transporte de L-leucina. Se determinaron las velocidades de entrada de L-leucina en células de las cepas KE5-17B y KE5-3C crecidas en medio MP y precargadas con diferentes aminoácidos durante los últimos 90 minutos de crecimiento, Tabla VII. 3.

Tabla VII. 3. Efecto de precargar las células con aminoácidos sobre el transporte de L-¹⁴C-leucina

Adiciones	% de Inhibición	
	KE5-17B	KE5-3C
leucina	35	53
isoleucina	28	56
valina	13	58
metionina	9	71
TFL	10	26
alanina	5	75
treonina	5	92
serina	8	69
glutámico	8	67
glutamina	7	79
asparagina	0	74
lisina	- 44	21
histidina	nd	21
α-aminobutírico	0	87

Las células crecieron en medio MP; 90 minutos antes de la cosecha los cultivos se fraccionaron y cada fracción fue suplementada con los aminoácidos indicados en concentración 0,5 mM (cepa KE5-17B) ó 5,0 mM (cepa KE5-3C). Luego de cumplido el tiempo de precarga, las células fueron tratadas como se describió en Materiales y Métodos para medir el transporte de L-¹⁴C-leucina 0,05 mM (cepa KE5-17B, control: 0,15 μmol min⁻¹ g⁻¹) ó 0,5 mM (cepa KE5-3C, control: 3,09 μmol min⁻¹ g⁻¹).

Los datos de la Tabla VII. 3, muestran que en la cepa KE5-17B la velocidad de entrada de L-¹⁴C-leucina 0,05 mM es inhibida en apenas un 35% y 28% cuando las células son precargadas con leucina o isoleucina respectivamente, en concentración 0,5 mM.

Si las células son precargadas con concentraciones mayores de leucina (1,0-10 mM), los porcentajes de inhibición no se incrementaron significativamente, 40% para leucina 1,0 mM y un valor constante de 45% para las concentraciones de leucina 2,5, 5,0 y 10 mM.

Estos resultados pueden explicarse teniendo en cuenta que el sistema de transporte de L-leucina presente en esta cepa, S1, es de baja velocidad máxima y que el sistema se encuentra saturado a la concentración de leucina 0,5 mM y por lo tanto el aumento de la concentración de leucina en el medio de cultivo no produce aumentos significativos en los porcentajes de inhibición.

El efecto activador de lisina se entiende debido a que la cepa KE5-17B requiere lisina para crecer y probablemente al tiempo en el que se realizan las adiciones, este aminoácido haya sido consumido, y por lo tanto el agregado del mismo favorece la síntesis de proteínas provocando el aumento observado de la actividad de S1.

La presencia de sulfato de amonio 10 mM en el cultivo durante 90 minutos produjo una inhibición del 43% en la actividad de transporte de L-leucina. A este respecto, Roon y col. (1977a) demostraron interacciones negativas entre los sistemas de transporte de aminoácidos y los sistemas de transporte de metilamina/iones amonio, sugiriendo que estos sistemas de transporte podrían utilizar algún elemento común para el transporte o una fuente de energía que está presente en cantidades finitas, y por lo tanto limita la velocidad de ambos tipos de sistemas de transporte cuando están simultáneamente saturados con sustrato.

En contraste, en la cepa KE5-3C, el transporte de L-¹⁴C-leucina 0,5 mM, sistema S2, es inhibido significativamente al precargar las células con diferentes aminoácidos.

La treonina es el aminoácido más efectivo junto con el ácido α -aminobutírico causando un 90% de inhibición, mientras que la lisina, la histidina y la TFL tienen un efecto muy limitado. Precargando las células con los aminoácidos de cadena ramificada, el transporte de L-leucina solamente se inhibe entre el 50-60%. Para el resto de los aminoácidos ensayados las inhibiciones fueron entre el 70-80%. En general, los

valores de inhibición del transporte de L-leucina, obtenidos precargando las células con cada uno de los aminoácidos, se correlacionan bien con aquellos obtenidos en los ensayos de competencia (Tabla V. 4, V. 5 y V. 7). Nuevamente, se pone de manifiesto que el sistema de transporte de L-leucina de baja afinidad y muy alta capacidad, es poco específico. No se descarta que además, excepto los aminoácidos de cadena ramificada, el resto de los aminoácidos analizados entren a las células por sus sistemas más específicos, y en consecuencia, el reservorio intracelular de aminoácidos aumente causando un efecto transinhibitorio o que compitan por un factor común, necesariotanto para el transporte de L-leucina por el sistema S2 como para el transporte de los aminoácidos ensayados por sus sistemas específicos.

La adición de peptona o extracto de levadura 1%, fuentes complejas de nitrógeno, al medio de cultivo MP causaron una inhibición del 71 y 66% respectivamente sobre la entrada de L-leucina, mientras que la inhibición producida por la adición de sulfato de amonio 10 mM fue del 93%, con una reducción de la velocidad inicial de transporte de L-leucina a $0,22 \mu\text{mol min}^{-1} \text{g}^{-1}$. Debe tenerse en cuenta que a partir de iones amonio y glutamato se sintetiza glutamina, pudiendo ser este aminoácido el causante de la inactivación observada. Otra posibilidad, es la que se comentó para la inhibición por iones amonio del transporte de leucina en la cepa KE5-17B o una combinación de ambas. Por otra parte, el efecto fuertemente inhibitorio de los iones amonio sobre la actividad de transporte de L-leucina por el sistema S2, es diferente del encontrado cuando el transporte del mismo se midió en células crecidas en medio mínimo conteniendo iones amonio como única fuente de nitrógeno durante todo el crecimiento.

VII. 2. 2. Efecto de la fuente de nitrógeno sobre el transporte de los aminoácidos de cadena ramificada

Resultados presentados por el grupo de Grenson han demostrado que en mutantes *gap1*, las actividades de las permeasas específicas de aminoácidos, histidina, serina, alanina, metionina, valina, triptofano, lisina, arginina, son independientes de la fuente de nitrógeno presente en el medio de cultivo (Grenson y col., 1970). Por lo tanto, las velocidades iniciales de transporte de los aminoácidos citados, no se modifican durante el crecimiento exponencial de las células, en medios mínimos con prolina o

iones amonio como fuentes de nitrógeno. En la Tabla VII. 4 se comparan los valores de velocidad inicial de entrada de los aminoácidos de cadena ramificada en las células de las cepas KE3-R23, MMY2/H3/LT1, KE5-17B y KE5-3C crecidas en diferentes medios de cultivo, recopilados de las Tablas V. 1, VI. 1 y VI. 2.

Tabla VII. 4. Efecto de la fuente de nitrógeno sobre el transporte de los aminoácidos de cadena ramificada

Cepa	Medio de cultivo	Velocidad inicial de entrada L- ¹⁴ C-aminoácidos (0,05 mM)		
		leucina	isoleucina	valina
KE3-R23	YPD	0,76	0,28	0,26
	MP	0,43	0,51	0,24
	MA	0,12	0,11	0,10
MMY2/H3/LT1	YPD	0,12	0,07	0,04
	MP	0,09	0,07	0,06
	MA	0,05	0,02	0,03
KE5-17B	YPD	0,16	--	0,08
	MP	0,15	0,14	0,07
	MA	0,12	0,11	0,06
KE5-3C	YPD	0,38	--	0,21
	MP	0,94	0,90	0,50
	MA	0,36	0,86	0,31

Cepa	Medio de cultivo	Velocidad inicial de entrada L- ¹⁴ C-aminoácidos (1,0 mM)		
		leucina	isoleucina	valina
KE3-R23	YPD	3,08	1,15	1,41
	MP	1,85	2,15	1,38
	MA	0,36	0,35	0,84
MMY2/H3/LT1	YPD	0,75	0,26	0,32
	MP	0,56	0,44	0,31
	MA	0,28	0,14	0,25
KE5-17B	YPD	0,47	--	0,39
	MP	0,46	0,38	0,44
	MA	0,27	0,32	0,30
KE5-3C	YPD	1,95	--	2,29
	MP	5,94	5,93	5,31
	MA	2,06	3,72	3,05

La velocidad inicial de transporte se expresa en $\mu\text{mol min}^{-1} \text{g}^{-1}$

Los datos de la Tabla VII. 4 muestran que en la cepa KE5-17B *gap1let2*, las velocidades iniciales de transporte de L-leucina 0,05 ó 1,0 mM son similares en los medios YPD y MP y levemente inferiores en medio MA. Así, el gen *LET1* y su producto la proteína codificada por el mismo, la permeasa S1, no están sujetas a la represión catabólica y a la inactivación catabólica por nitrógeno, respectivamente.

En contraste, la incorporación de L-leucina en la cepa KE3-R23 *gap1* fue más alta en células crecidas en medio MP que en medio MA. La disminución en la actividad de transporte en medio MA, es más significativa a la concentración externa de L-leucina 1,0 mM. En estas condiciones opera preferentemente el sistema S1 de transporte de L-leucina.

Más aún, similares valores de velocidades iniciales se obtuvieron en células de las cepas KE3-R23 *gap1*, MMY2/H3/LT1 *gap1let1let2* y KE5-17B *gap1let2* crecidas en medio MA. Estos resultados, junto con los valores de los parámetros cinéticos determinados en las cepas parentales, indican que en la cepa *gap1* el sistema S2 de baja afinidad y alta capacidad es prácticamente inactivo en medio MA.

La pérdida de actividad del sistema S2 puede deberse a los mecanismos regulatorios denominados represión y/o inactivación catabólica por nitrógeno, tal como ocurre con la regulación de la actividad de la GAP1 (Grenson, 1992). La mutación *let2* podría estar asociada a la pérdida de la reactivación cuando prolina es la fuente de nitrógeno, el producto del gen *LET2* actuaría como un factor positivo catalizando el proceso de reactivación, no se excluye la posibilidad que LET2 actúe como un factor positivo en la síntesis del sistema S2.

En la cepa KE5-3C, en la que opera un sistema de transporte de leucina de baja afinidad y muy alta capacidad, el valor de velocidad inicial de L-leucina disminuyó a la mitad en las células crecidas en medio MA comparado con el valor obtenido en medio MP, pero siempre fue más alto que en la cepa parental KE3-R23: 2,06 versus 0,36 $\mu\text{mol min}^{-1} \text{g}^{-1}$. Los resultados obtenidos en estas dos cepas para el transporte de L-leucina por el sistema de baja afinidad parecen contradictorios, pero otra posibilidad a considerar, teniendo en cuenta que la segregación observada en las tetradas con respecto al sistema S2 no es 2:2, sería la presencia de una tercera mutación, que desreprime el sistema de transporte en medio MA.

La entrada de L-isoleucina y L-valina en la mayoría de los aspectos, sigue el patrón descrito para la entrada de L-leucina.

VII. 3. Conclusiones

En este capítulo se describen las relaciones entre los sistemas de transporte de los aminoácidos de cadena ramificada. Se determinó que:

- en la cepa 17B en la que el transporte de leucina, isoleucina y valina, es mediado por un sistema de alta afinidad-baja velocidad, cada uno de los tres aminoácidos de cadena ramificada inhibe competitivamente el transporte de los otros dos, con valores de K_i similares a los valores de K_T determinados para su propio transporte;
- el sistema de transporte S1 es inhibido competitivamente por metionina, norleucina y TFL;
- el sistema S1 de transporte de L-leucina, es una permeasa común para el transporte de isoleucina y valina, que también transporta el análogo tóxico TFL y probablemente metionina y norleucina;
- la presencia de L-leucina a diferentes concentraciones en el medio de crecimiento causa una inhibición de su propio transporte por S1, que no supera el 45%, de los aminoácidos ensayados a concentración 0,5 mM, solamente L-isoleucina produjo un efecto inhibitorio (30%), valina, TFL y glutamato tuvieron un efecto muy limitado; los iones amonio (20 mM) produjeron 40 % de inhibición;
- la actividad de transporte de los aminoácidos de cadena ramificada por el sistema S1, no está sujeta a la represión e inactivación catabólica por nitrógeno;
- en la cepa 3C, el transporte de L-leucina por el sistema de baja afinidad-muy alta velocidad (S2), es inhibido competitivamente por los aminoácidos de cadena ramificada, por metionina y norleucina, con valores de K_i similares o aún menores que el valor de K_T determinado para leucina (0,32 mM), los valores de las K_i por isoleucina y valina son del orden de los valores de K_T determinados para su propio transporte, TFL inhibe competitivamente el transporte de leucina pero con muy baja afinidad ($K_i = 4,44$ mM); alanina también es inhibidor competitivo del transporte de leucina por el sistema S2;
- el sistema S2 transporta los aminoácidos de cadena ramificada con baja afinidad y alta capacidad y también metionina, alanina y norleucina;

- la presencia de la mayor parte de los aminoácidos ensayados en el medio de crecimiento inhiben (55-95%) el transporte de L-leucina por el sistema S2, solamente los aminoácidos básicos lisina e histidina y TFL tuvieron efectos poco significativos;

- en la cepa 3C el transporte de los aminoácidos de cadena r

- el agregado de peptona, extracto de levadura y amonio durante el crecimiento inhibieron significativamente el transporte posterior de L-leucina por el sistema S2, este efecto es muy importante con amonio;

- en la cepa 3C el transporte de los aminoácidos de cadena ramificada por el sistema de baja afinidad-muy alta velocidad (S2) no está sujeto a los procesos regulatorios regulatorios observados en ambas cepas parentales, por el contrario se encuentra desreprimido en medio MA;

DISCUSSION

DISCUSION

En levadura *Saccharomyces cerevisiae*, trabajos previos han demostrado que el transporte de L-leucina es mediado por tres sistemas: la permeasa general de aminoácidos, GAP1 (Grenson y col., 1970; Kotliar y col., 1994), que transporta L-leucina con alta afinidad y alta velocidad y al menos otros dos sistemas, más específicos, uno que exhibe alta afinidad y baja capacidad, S1, y otro de baja afinidad y alta capacidad, S2 (Kotliar y col., 1994; Ramos y col., 1977, 1979, 1980; Stoppani y Ramos, 1978).

La actividad de la GAP1 es regulada por la disponibilidad de la fuente de nitrógeno en el medio de cultivo y es activa solamente si la fuente de nitrógeno está presente en una forma que es relativamente difícil de utilizar, como es el caso de L-prolina o urea. En medios con iones amonio, glutamina o una fuente compleja de nitrógeno (YPD), la permeasa sufre progresivamente una rápida y completa inactivación (NCI) (Dubois y Grenson, 1979; Grenson, 1983 a y b; Grenson y Acheroy, 1982; Grenson y Dubois, 1982) siendo la inhibición de su actividad reversible y/o la represión de su síntesis a nivel transcripcional (NCR) (Grenson, 1983 a y b; Jauniaux y Grenson, 1990).

En células de la cepa silvestre MMY2, crecidas en un medio conteniendo L-prolina, la presencia de la GAP1 enmascara la participación de los sistemas S1 y S2 en el transporte de L-leucina, ésta, sin embargo, es puesta de manifiesto cuando las células son crecidas con iones amonio o en medio YPD.

Un avance en el conocimiento de la participación de sistemas múltiples en el transporte de nutrientes, ha sido posible por el estudio en cepas silvestres y en mutantes deficientes en el transporte, aisladas a partir de las primeras. Un gran número de transportadores de aminoácidos han sido detectados por el aislamiento de mutaciones que selectivamente inactivan una permeasa, sin alterar las actividades enzimáticas involucradas en la biosíntesis del aminoácido correspondiente. La inhibición competitiva, el comportamiento cinético y regulatorio, son utilizados como criterios para distinguir un sistema de transporte de otro. La metodología utilizada para aislar mutantes deficientes en el transporte de un dado aminoácido, se basa en la selección de cepas resistentes a análogos tóxicos que entran a la célula por la/s misma/s permeasa/s que los sustratos naturales.

A este respecto, estudios sobre el transporte de L-leucina en la cepa mutante MMY2/H3 *gap1*, demostraron que los sistemas S1 y S2 son activos (Kotliar y col.,

1994). Sin la interferencia de la actividad de la GAP1, se determinaron las propiedades cinéticas de S1 y S2 y que sus actividades relativas dependen de la fuente de nitrógeno presente en el medio de cultivo y del estado energético de las células (Ramos y col., 1975,1977,1980; Stoppani y Ramos, 1978). No obstante, no se pudieron caracterizar individualmente otras propiedades de S1 y S2, debido a la interferencia de la superposición de sus actividades.

Teniendo en cuenta lo descrito, uno de los objetivos de este trabajo fue la identificación y caracterización bioquímica y/o genética de mutantes deficientes en el transporte de L-leucina por los sistemas S1 y/o S2, como un paso clave y previo, al clonado de los genes estructurales y/o regulatorios involucrados en el transporte de L-leucina.

El estudio se llevó a cabo en la cepa mutante MMY2/H3/LT1 *gap1TFL^R*, aislada a partir de la cepa MMY2/H3 *gap1* por su resistencia a la inhibición del crecimiento en presencia de triflúorleucina. La TFL, un análogo tóxico de leucina, ha sido utilizada para la selección de otros tipos de mutantes de levadura: mutantes *LEU4^{ubr}*, en las que la actividad de la enzima α -isopropilmalato (α -IPM) sintetasa, es resistente a la retroinhibición por leucina, el producto final de la vía biosintética (Baichwal y col., 1983) y mutantes con una actividad de transporte de L-leucina aumentada (Bussey y Umberger, 1970 a y b).

La segregación del carácter de resistencia a TFL en 14 tetradas obtenidas luego de la esporulación de la diploide KE5 (MMY2/H3/LT1 *gap1TFL^R* x KE3-R23 *gap1*), indicó que al menos dos genes que segregan independientemente, denominados *let1* y *let2* (leucine transport), se requieren para la resistencia completa a TFL en la cepa mutante MMY2/H3/LT1 (Tabla II. 1).

En medio mínimo sólido, la mutante *gap1let1let2* presenta trazas de crecimiento sobre las siguientes fuentes de nitrógeno: leucina, isoleucina, valina, metionina, fenilalanina, treonina y serina, agregadas al medio de cultivo individualmente. Además, la cepa *gap1let1let2* es resistente a la inhibición del crecimiento en medio MP, en presencia de los siguientes análogos tóxicos: L-etionina (L-metionina), β -2-tienilalanina (L-fenilalanina) y azaserina (L-serina). Por lo tanto, estos resultados concordantes indican que las mutaciones *let* afectaron la actividad de transporte y/o utilización de un amplio grupo de aminoácidos, tanto hidrofóbicos como hidrofílicos, en el caso de serina

y treonina. En contraste, las cepas *gap1* crecen en las fuentes de nitrógeno nombradas y son sensibles a los análogos tóxicos (Tablas III. 10 y III. 11).

Cuando las fuentes de nitrógeno utilizadas fueron glutamina, asparagina, arginina, glutamato, aspartato, alanina, α -aminobutirato, prolina, iones amonio o una fuente compleja, como la presente en los medios YPD o Wickerham, se obtuvo buen crecimiento de la cepa MMY2/H3/LT1 y similar al de la cepa parental. Por consiguiente, las mutaciones *let* no afectaron la capacidad de transporte y/o utilización de los aminoácidos mencionados, para los cuales, en su mayoría, se han descrito sistemas de transporte específicos (Cartwright y col., 1989; Darté y Grenson, 1975; Gregory y col., 1982; Grenson y Dubois, 1982; Grenson y col., 1966; Lasko y Brandriss, 1981; Zhu y col., 1996) y de los iones amonio (Dubois y Grenson, 1979). Es interesante señalar que la cepa MMY2/H3/LT1 es sensible a la presencia en el medio de cultivo de L-canavanina y β -cloroalanina, análogos tóxicos de arginina y alanina, respectivamente.

En los medios líquidos mínimos con L-prolina o iones amonio, como en los medios complejos YPD o Wickerham, las velocidades de crecimiento fueron similares a las de las cepas silvestre y mutantes *gap1* (Tabla III.1). Sin embargo, cuando L-leucina en concentración 10, 4 ó 1 mM es la única fuente de nitrógeno, el tiempo de generación (G) aumenta 180 min con respecto a los obtenidos para las mutantes *gap1*, ensayadas en las mismas condiciones (Tabla III. 2).

Este último resultado se correlaciona con la reducida velocidad de transporte y de acumulación de L-leucina en la cepa mutante MMY2/H3/LT1, con respecto a los valores obtenidos en la cepa parental MMY2/H3 *gap1* (Kotliar y col., 1994) y en la cepa KE3-R23 *gap1* (congénica de MMY2/H3). La extensión de esta disminución, depende de la fuente de nitrógeno utilizada y de la concentración de L-¹⁴C-leucina ensayada.

A baja concentración externa del aminoácido, en células crecidas en los medios MP, YPD o Wickerham, la actividad de transporte de L-leucina se reduce 4-5 veces y en medio MA ésta solamente cae a la mitad. A la concentración externa 1,0 mM de L-leucina, la reducción en los valores de su transporte es de 3-4 veces en los medios MP, YPD o Wickerham, mientras que en medio MA se obtuvieron similares valores a los de las cepas *gap1* (Tablas III. 3 - III. 5 y Figuras III.1 - III. 2).

Por otra parte, con respecto al efecto de la calidad de la fuente de nitrógeno del medio de cultivo, sobre la actividad de transporte de L-leucina, éste es poco importante

en la cepa MMY2/H3/LT1, en fuerte contraste a lo observado en las cepas *gap1* KE3-R23 y MMY2/H3 (Kotliar y col., 1994, Sáenz, 1995; Stella, 1990) o en la cepa KT308 que no presenta actividad de GAP1 (Sáenz y col., 1997). Así, en células de la cepa KE3-R23 crecidas en los medios YPD y MP, los valores de transporte de L-leucina fueron similares y 4-9 veces mayores que los valores de aquellas provenientes del medio MA, mientras que en la cepa MMY2/H3/LT1 la diferencia a lo sumo es del doble.

En las condiciones experimentales ensayadas, el proceso residual de transporte de L-leucina en la mutante MMY2/H3/LT1, es concentrativo y es inhibido 35-55% por DNP y NaN_3 (Tabla III. 6). Más aún, la ausencia de transporte de L-leucina a 0 °C también indica que la baja capacidad de transporte en la cepa *gap1let1let2* no se debe a un proceso de difusión (Figura III. 1). La excepción corresponde a las células cultivadas en medio MA y cuando el transporte se ensaya con L-leucina 1,0 mM, en que el proceso no es concentrativo.

En células de la cepa KE3-R23 *gap1*, crecidas en los dos medios mínimos, la cinética de transporte de L-leucina, en función de las concentraciones externas del aminoácido, según el análisis de Eadie-Hofstee, produjo una curva bifásica, indicando que el transporte de L-leucina es mediado por dos sistemas: un sistema de alta afinidad ($K_T = 50 \mu\text{M}$) y baja velocidad y otro sistema de baja afinidad ($K_T = 0,40 \text{ mM}$) y alta velocidad (Figuras III. 3A y III. 4 A, Tabla III. 7). Los valores de los parámetros cinéticos K_T y $J_{\text{máx}}$ son semejantes a los descriptos para los sistemas S1 y S2 en la cepa MMY2/H3 (Kotliar y col., 1994).

Un análisis similar de los datos cinéticos para la cepa MMY2/H3/LT1 *gap1let1let2*, condujo a una representación lineal, consistente con la operación de un único sistema de transporte de L-leucina (Figuras III. 3B y III. 4B). El valor de $K_T = 0,30\text{-}0,40 \text{ mM}$ es similar al del sistema S2 descripto en la cepa KE3-R23, mientras que el valor de $J_{\text{máx}}$ fue sustancialmente inferior en células provenientes del medio MP, aunque similar a las provenientes del medio MA (Tabla III. 7). No se detectó actividad de transporte de L-leucina por el sistema S1 de alta afinidad en células crecidas en ambos medios mínimos.

Estos resultados demuestran que la permeasa de leucina de alta afinidad-baja capacidad (S1), es primariamente responsable de la acumulación intracelular de TFL a niveles tóxicos, ya que este sistema no es detectado en la mutante resistente a TFL

cepa MMY2/H3/LT1. De esta manera, el componente mayor de resistencia a TFL está asociado con la mutación *let1* que inactiva la función de alta afinidad. Por otra parte, ambas cepas presentan similares valores de $J_{m\acute{a}x}$ por el sistema S2 en medio MA, pero en medio MP el valor de $J_{m\acute{a}x}$ es 4-5 veces inferior en la mutante MMY2/H3/LT1 que el valor descripto para el S2 en la cepa KE3-R23 y, por lo tanto, la segunda mutación *let2* es atribuída a la disminución en el valor de $J_{m\acute{a}x}$ cuando las células crecen en medio MP. Presumiblemente, la mutación *let2* es responsable de la modificación de la actividad del sistema de alta capacidad (S2), que limita la utilización catabólica de varios aminoácidos. Los cambios en el sistema S2 de baja afinidad-alta capacidad pueden explicarse en términos de: 1) la mutación *let2* inactiva completamente la permeasa de baja afinidad, desenmascarando un sistema superpuesto de baja velocidad y con similar afinidad al sistema S2; 2) la mutación *let2* evita la desrepresión del sistema S2 cuando las células son crecidas en medio MP; 3) la mutación *let2* disminuye la distribución de las moléculas de la permeasa S2 a la membrana plasmática y, 4) la mutación *let2* disminuye la capacidad de la permeasa en el transporte de un dado aminoácido, sin afectar la afinidad de la permeasa por el mismo.

Experimentos de inhibición, utilizando como potenciales inhibidores varios aminoácidos no radiactivos, demuestran que la entrada de L-¹⁴C-leucina en la mutante MMY2/H3/LT1 es inhibida por una amplia serie de aminoácidos, tanto hidrofóbicos como hidrofílicos, así como también por los aminoácidos ácidos glutamato y aspartato (Tabla III. 8). El mismo patrón de inhibición del sistema de transporte de baja afinidad fue encontrado en la cepa parental MMY2/H3 (observaciones de nuestro laboratorio) y en la inhibición del transporte de L-¹⁴C-leucina 1,0 mM por los aminoácidos de cadena ramificada, metionina, norleucina, alanina y serina en la cepa KE3-R23 (Tabla III. 8). Estos resultados sugieren que el mismo sistema de transporte de baja afinidad está presente en las tres cepas y que éste es de amplia especificidad. Aunque, en algunos aspectos, el sistema S2 es semejante a la GAP1, a diferencia de ésta, el sistema S2 no transporta citrulina, un sustrato específico de la GAP1 (Grenson y col., 1970), y lisina y arginina que son transportadas con alta afinidad por la GAP1 (Grenson y col., 1970). El transporte de L-leucina por el sistema S2 tampoco es inhibido por L-prolina, aminoácido que es transportado por el sistema altamente específico PUT4 (Lasko y Brandriss, 1981). Es interesante señalar que TFL produce una inhibición diferencial sobre el

transporte de L-¹⁴C-leucina 0,05 mM: 40% en la cepa KE3-R23 y 8% en la mutante MMY2/H3/LT1, resultado que refuerza la pérdida de actividad de la permeasa de alta afinidad-baja capacidad (S1), en la cepa parental mutante.

Los perfiles de inhibición del transporte de L-leucina observados en este trabajo, son parecidos a los resultados obtenidos por Garrett (1989) en una cepa mutante *aat1* y por Heinemann y col. (1994) en estudios de cepas *LUP1* y *lup1*.

En el caso de la mutación *aat1*, cuando está combinada con el alelo *leu2*, la levadura es incapaz de crecer sobre medio rico (YPD) o en medio MA suplementado con isoleucina, valina, metionina, fenilalanina y tirosina. Además, la preincubación de las células *aat1leu2* con los aminoácidos que inhiben el crecimiento, también inhibieron el transporte de L-leucina. La regulación de la GAP1 en la cepa parental *AAT1leu2* utilizada por Garrett, es la usual, activa en medio MP e inactiva en medio MA, en cambio, la cepa mutante *aat1leu2* tiene un sistema GAP1 funcional en los dos medios mínimos. Por consiguiente, es conveniente comparar los parámetros de regulación en esas cepas con los de las cepas MMY2 silvestre y la revertante MMY2/LT1/GAP1 *let1let2*. En contraste a la cepa mutante de Garrett, la inhibición/represión por iones amonio es idéntica en las cepas MMY2 silvestre y MMY2/LT1/GAP1 *let1let2*: la medida del transporte de L-¹⁴C-citrulina 0,05 mM en medio MA fue de 0,03 y 0,08 $\mu\text{mol g}^{-1} \text{min}^{-1}$, respectivamente, y en medio MP fue de 2,64 y 2,19 $\mu\text{mol g}^{-1} \text{min}^{-1}$, respectivamente (Capítulo IV. 1. 4). Por lo tanto, la posible presencia de la mutación *aat1* parece improbable.

En el caso del gen *LUP1*, éste es un componente regulatorio involucrado en la represión del sistema de transporte de leucina, metionina y fenilalanina de alta-afinidad y baja capacidad descrito por Heinemann y col. (1994). En cepas *lup1*, el sistema de transporte de los aminoácidos hidrobólicos ha sido liberado de la represión por iones amonio, aumentando entre 10-20 veces el transporte con respecto a la cepa *LUP1*. El comportamiento cinético de la mutante MMY2/H3/LT1, en la cual no se detecta el transporte de L-leucina de alta afinidad y baja capacidad, junto con los valores similares de actividad en los medio MP y MA, excluyen la presencia de la mutación *lup1* en la mutante descrita en este trabajo.

Otras mutaciones asociadas con el transporte de leucina, entre otros aminoácidos, son: *aap1* (Surdin y col., 1965) y sus alelos *apf1* (Grenson y Hennaut, 1971) y *shr3*

(Ljungdahl y col., 1992), aisladas en varios laboratorios como resistentes a varios análogos tóxicos de aminoácidos. Esas mutaciones afectan la actividad de la permeasa general de aminoácidos y, también, la actividad de varias permeasas específicas de aminoácidos, disminuyendo los valores de $J_{m\acute{a}x}$ sin modificar apreciablemente los valores de K_T (reducido transporte de prolina, arginina, lisina, histidina, glutamato, leucina, metionina, serina y valina) (Grenson y Hennaut, 1971). Todas las mutaciones nombradas impiden el crecimiento celular en medio mínimo con L-prolina como fuente de nitrógeno y son resistentes a L-canavanina, características que no son observadas en la cepa MMY2/H3/LT1. Más aún, células *gap1apf1* son incapaces de crecer con glutamato o aspartato como únicas fuentes de nitrógeno (Grenson y Hennaut, 1971), mientras que las células de MMY2/H3/LT1 crecen (Tabla III. 10). El trabajo de Ljungdahl y col. (1992) demostró que el producto del gen *SHR3* es requerido para la correcta localización de la GAP1 y de otras permeasas de aminoácidos en la membrana plasmática. Sin embargo, no se conoce si el gen *SHR3* es requerido para la actividad normal de transporte de L-leucina por el sistema S2. Debido a que en la revertante MMY2/LT1/GAP1 *let1let2*, la GAP1 es altamente activa y que las células recobran la capacidad de crecer como la cepa silvestre en los medios mínimos conteniendo leucina, isoleucina y valina como fuente de nitrógeno (Figura III.10), se excluye la presencia del alelo *shr3* en la revertante y en la mutante MMY2/H3/LT1 *gap1let1let2*.

McCusker y Haber (1990), han aislado cuatro diferentes loci *raa* como resistentes a triazolalanina, TFL, β -2-tienilalanina y β -cloroalanina, en medio mínimo con urea como fuente de nitrógeno. En medio MP, con o sin los análogos tóxicos, la mutante *raa4* no crece; en contraste, la revertante *let1let2* crece normalmente en medio con prolina como fuente de nitrógeno. Las mutantes *raa1*, -2 y -3 en medio MP, son sensibles a la presencia de triazolalanina y β -cloroalanina y muestran un crecimiento muy reducido cuando el medio contiene TFL o β -2-tienilalanina. Los resultados obtenidos en la revertante *let1let2* muestran que ésta también es sensible y no crece en presencia de estos análogos (Tabla III. 11). Con el fin de diferenciar *raa1*, -2 y -3 de *let1let2*, se comparó el transporte de L-leucina en condiciones de desrepresión de la GAP1. Las mutantes *raa1*, -2 y -3 presentan mayores actividades de transporte que la cepa silvestre (McCusker y Haber, 1990); en cambio, la actividad de transporte en la revertante *let1let2* fue siempre menor que la de la cepa silvestre MMY2: 2,72 y 4,35

$\mu\text{mol g}^{-1} \text{min}^{-1}$, respectivamente, a la concentración 0,05 mM de L-leucina externa y de 5,17 y 7,53 $\mu\text{mol g}^{-1} \text{min}^{-1}$, respectivamente, a la concentración 1,0 mM de L-leucina externa.

Se ha demostrado que el transporte de aminoácidos en levadura es un proceso impulsado por un gradiente electroquímico de protones, generado por la H^+ -ATPasa de membrana plasmática (Eddy, 1982; Horák, 1986). Es improbable que las mutaciones *let* afecten el gradiente electroquímico de protones. Los valores de ΔpH , así como los de la actividad de la H^+ -ATPasa de membrana plasmática, determinados en la mutante *MMY2/H3/LT1* (Figuras III. 5 y III. 6), son similares a los de la cepa parental *MMY2/H3* (Sáenz, 1995; Stella, 1990; Stella y col., 1992).

Como se comentó previamente, TFL ha sido utilizada para aislar mutantes afectadas en la vía de la biosíntesis de leucina (Baichwal y col., 1983). Esas mutantes, resistentes a TFL, exhiben el gen *LEU4* alterado (*LEU4^{fbr}*) y la α -IPM sintetasa es resistente a la retroinhibición por leucina y, consecuentemente, acumulan concentraciones intracelulares anormalmente altas de leucina (15 veces mayor que una cepa normal). Dado que la mutante *MMY2/H3/LT1* no exhibe tal acumulación intracelular de leucina, con un valor comparable al de la cepa parental *MMY2/H3*, se excluye la presencia del alelo *LEU4^{fbr}*.

En las cepas *gap1 MMY2/H3* (Kotliar y col., 1994) y *KE3-R23* (Tabla III. 8), el transporte de L-leucina por los sistemas S1 y S2 es inhibido, entre otros aminoácidos, por L-isoleucina y L-valina, estructuralmente relacionados con L-leucina. Las propiedades del transporte de estos dos aminoácidos de cadena ramificada en *S. cerevisiae*, han sido poco estudiadas. Asimismo, como la especificidad de sustrato del transporte de leucina por los sistemas S1 y S2 no se estudió en más detalle, varios autores asumieron tácitamente la posibilidad que isoleucina y valina fueran también sustratos de los sistemas S1 y S2.

Por otra parte, la cepa mutante *MMY2/H3/LT1 gap1let1let2* presenta un reducido transporte de leucina y, en medio sólido, solamente se observan trazas de crecimiento cuando los aminoácidos de cadena ramificada fueron utilizados individualmente como fuente de nitrógeno.

Estos antecedentes impulsaron el estudio del transporte de L-isoleucina y L-valina y sus relaciones con los sistemas de transporte de L-leucina: GAP1, S1 y S2, en la cepa MMY2 y en las mutantes isogénicas derivadas de la misma.

Para conocer la contribución en el transporte de ambos aminoácidos por la GAP1, se utilizaron las cepas MMY2 normal y la mutante *gap1* MMY2/H3.

Las determinaciones de la velocidad inicial de transporte de cada aminoácido, en células de las cepas normal y *gap1* crecidas en medio MP, condición de desrepresión de la GAP1, indican una participación de la permeasa general de aminoácidos de aproximadamente 85-90% en la actividad total de transporte de los mismos, ensayados a las concentraciones externas 0,05 y 1,0 mM (Figuras IV. 1, IV. 2, IV. 5 y IV. 6 y Tablas IV. 1-IV. 3). Cuando se compara la actividad de transporte de L-isoleucina y L-valina en las cepas silvestre y *gap1*, la presencia de la GAP1 en la cepa MMY2, aumenta 9 veces los valores de velocidad inicial (1-2 min) de L-isoleucina o L-valina 0,05 mM, alcanzando una rápida saturación, aunque al cabo de 10 min, ambas cepas presentan similares valores de acumulación; a la concentración 1,0 mM, el aumento producido es entre 6-7 veces. El aporte de la GAP1 puede variar entre 5-460 veces, dependiendo del aminoácido y de la cepa de levadura empleada (Courchesne y Magasanik, 1983; Grenson y col., 1970). Aún el reducido transporte de ambos aminoácidos en la cepa *gap1*, comparado con el mediado por la GAP1, es suficiente para permitir un crecimiento moderado de las células *gap1* en medios conteniendo isoleucina o valina como fuentes de nitrógeno, comparado con el denso crecimiento de la cepa silvestre (Tabla III. 10).

En células crecidas en medio complejo YPD o en medio MA, no se encuentran diferencias entre las cepas *GAP1* y *gap1* en los valores de velocidad inicial, así como en los de acumulación de L-isoleucina y L-valina, reflejando una completa inactivación de la GAP1. Estos resultados son similares a los descriptos para el transporte de L-leucina (Kotliar y col., 1994; Sáenz, 1995; Stella, 1990).

Sin embargo, cabe señalar la siguiente distinción entre el transporte de L-leucina y L-isoleucina, con el de L-valina en la cepa *gap1*: la actividad de transporte de L-isoleucina en células cultivadas en medio MP o YPD, es 5-7,5 veces mayor que las provenientes del medio MA, siendo el transporte muy poco concentrativo en este último medio; en contraste, la actividad de transporte de L-valina es poco afectada por la

calidad de la fuente de nitrógeno presente en el medio de cultivo y el proceso de transporte es concentrativo.

Los resultados descriptos permiten establecer que: 1) el transporte de L-isoleucina y L-valina es mediado por otro/s sistema/s diferentes de la GAP1, aunque su contribución a la actividad total es mucho menor y, 2) el transporte remanente de L-isoleucina es sensible a la presencia de iones amonio en el medio de cultivo.

El estudio del transporte en la mutante MMY2/H3/LT1, constituye una herramienta importante para indagar si las mutaciones *let* afectaron el transporte de isoleucina y valina. Los valores de velocidad inicial y de acumulación, en los tres medios de cultivo y a las dos concentraciones externas analizadas, demuestran claramente una reducción entre 4-13 veces en los valores del transporte de isoleucina y valina en la mutante *gap1let1let2*, con respecto a los valores obtenidos en la cepa parental *gap1* MMY2/H3.

En células de la cepa MMY2/LT1/GAP1 *let1let2*, crecidas en medio MP, el transporte de isoleucina y valina es mediado casi exclusivamente por la GAP1, los perfiles de incorporación de los aminoácidos son similares a los obtenidos en la cepa normal MMY2 (Figuras IV. 1, IV. 2, IV. 11 y IV. 12). Por otro lado, en células provenientes del medio YPD, los valores de las velocidades iniciales son idénticos a los obtenidos en la cepa MMY2/H3/LT1 *gap1let1let2*, indicando la completa inactivación de la GAP1 (Tablas IV. 4 y IV. 5). Sin embargo, en células provenientes del medio MA, aún siendo limitada la capacidad de transporte de isoleucina y valina, es mayor que la obtenida en la cepa MMY2/H3/LT1, indicando una reducida actividad de la GAP1 en estas condiciones (Tablas IV. 4 y IV. 5). Es más, los valores a 10 min de la acumulación de isoleucina 0,05 mM en la revertante MMY2/LT1/GAP1 *let1let2*, son similares en los dos medios mínimos, en contraste con la cepa silvestre, indicando nuevamente que el/los sistema/s de transporte de isoleucina afectados por las mutaciones *let*, son sensibles a la presencia de iones amonio en el medio de cultivo.

Las determinaciones cinéticas y los parámetros calculados para las distintas cepas (Tablas IV. 6 y IV. 7 y Figuras IV. 13 - IV. 16), permiten concluir que, en condiciones de desrepresión de la GAP1 en la cepa MMY2, el único sistema caracterizado cinéticamente se debe a la superposición de la actividad de la GAP1 sobre los sistemas de transporte de isoleucina ($K_T = 0,20$ mM) y valina ($K_T = 0,40$ mM) detectados en la mutante MMY2/H3 *gap1*. En la cepa MMY2/H3/LT1 *gap1let1let2*, para cada aminoácido

se detectó un único sistema de transporte de afinidad similar a la de los sistemas descritos en la mutante *gap1* pero de muy baja velocidad máxima. En la cepa MMY2/LT1/GAP1 *let1let2*, el transporte de isoleucina y valina es mediado casi exclusivamente por la GAP1, exhibiendo alta afinidad y alta capacidad. Ferreras y col. (1989), mostraron que el transporte de valina (0,5 - 20 mM) por la GAP1 en *S. cerevisiae* var. *ellipsoideus*, exhibe dos componentes con valores de K_T de 1,02 y 12,51 mM y de J_{\max} de 2,5 y 6,1 $\mu\text{mol g}^{-1} \text{min}^{-1}$, respectivamente. Debido a que nuestras determinaciones en la cepa silvestre se efectuaron en un rango de concentraciones diferentes, 0,02 - 2,0 mM, probablemente no se detecten esos sistemas de baja afinidad.

Los resultados obtenidos para el transporte de leucina, en las cepas *gap1* y *gap1let1let2* (la mutación *let2* disminuye la actividad de transporte de leucina por el sistema S2 de baja afinidad) y para el transporte de isoleucina y valina, sugieren la existencia de, por lo menos, una permeasa o de un factor común necesario para el transporte de los aminoácidos de cadena ramificada.

Tullin y col. (1991), identificaron un sistema de alta afinidad, denominado BAP1, que transportaría los aminoácidos de cadena ramificada en condiciones de represión de la GAP1. Los valores de K_T obtenidos por esos autores para el transporte de leucina, isoleucina y valina, fueron 0,16, 0,31 y 2,0 mM, respectivamente. En mutantes *bap1*, los valores de K_T fueron 0,94, 4,2 y 7,2 mM para el transporte de leucina, isoleucina y valina, respectivamente, y son muy diferentes a los descritos en las mutantes MMY2/H3 y MMY2/H3/LT1. En contraste con los resultados del presente estudio, el transporte de leucina por el sistema BAP1 no es inhibido por fenilalanina, metionina o serina. Estas diferencias podrían deberse a que Tullin y col. utilizaron un medio sintético completo (medio MA con la adición de varios nutrientes: arginina, aspartato, glutamato, histidina, lisina, metionina, fenilalanina, serina, treonina, triptofano y tirosina) para el crecimiento y como medio de resuspensión de las células, para las determinaciones cinéticas y, por lo tanto, los valores de K_T obtenidos por esos autores pueden ser valores aparentes, debido a la posible inhibición competitiva por otros aminoácidos. Otra posible causa de las diferencias observadas, es que la mutación *bap1* fue obtenida en una cepa conteniendo la GAP1 y debido a que, en células silvestres crecidas en medio MA, hay aún una baja actividad de GAP1 (Kotliar y col., 1994; Tablas IV. 4 y

TFL), similares al de la cepa parental KE3-R23 *gap1*; en la cepa 3D (resistente a TFL), similar al valor de la otra cepa parental MMY2/H3/LT1 *gap1let1let2* y, en la cepa 3C (resistente a TFL), el valor de $J_{\text{máx}}$ es más del doble que el valor obtenido en la cepa KE3-R23. Por otra parte, en la tetrada KE5-17, tetratipo por el análisis de resistencia a TFL, se le asignaron a la cepa 17C (sensible a TFL), los alelos normales *LET1LET2*, sin embargo, no se detectó cinéticamente la presencia del sistema S2; las características cinéticas de la haploide 17D (resistente a TFL), son similares a las de la cepa MMY2/H3/LT1 *gap1let1let2*; en las cepas 17B (sensible a TFL) y 17A (resistente a TFL hasta 75 μM), se detectaron solamente el sistema S1 ($K_T = 0,04 \text{ mM}$) y el sistema S2 ($K_T = 0,20 \text{ mM}$), respectivamente, siendo la segregación de los genes como se esperaba *gap1let2* y *gap1let1*. Sin embargo, el sistema S2 caracterizado en la cepa 17A, tanto como en la cepa 3C, no es sensible a la presencia de iones amonio en el medio de cultivo (Tabla V.1 y Figuras V. 1 - V. 4), en fuerte contraste a la cepa parental KE3-R23 (Figura III. 2 y Tabla III. 5).

A partir de la identificación de cepas como la KE5-17B y KE5-3C, con sistemas de transporte únicos y con afinidades similares a la de los sistemas S1 ó S2, pudo estudiarse la especificidad de cada sistema sin la interferencia del otro.

Los resultados obtenidos en los ensayos de competencia de la entrada de L-¹⁴C-leucina por diferentes aminoácidos (Tablas V. 5 - V. 7), permitieron establecer:

- 1) el transporte de leucina por los sistemas S1 ó S2 no es inhibido por aminoácidos con el grupo amino en posición distinta de α .
- 2) el transporte de leucina por los sistemas S1 ó S2, no es inhibido por citrulina, transportada exclusivamente por el sistema GAP1 (Grenson y col., 1970); por prolina, transportada específicamente por la permeasa PUT4 (Lasko y Brandriss, 1981) y por cicloleucina (análogo cíclico de leucina).
- 3) el transporte de leucina por el sistema S1, es inhibido significativamente por isoleucina, valina, metionina, fenilalanina, cisteína y DL-homocisteína; por los análogos estructurales de leucina, como norvalina, norleucina y γ -metil leucina y por el análogo tóxico trifluorleucina. La inhibición por D-leucina sólo fue significativa (41%), cuando ésta se adiciona a una concentración 100 veces mayor que la de L-leucina radiactiva. El resto de los aminoácidos ensayados no produjeron inhibiciones o éstas fueron menores del 20%.

IV. 5), existe la posibilidad de que una parte de los valores del transporte y de competición obtenidos con las cepas *BAP1* y *bap1* reflejen actividad de la GAP1. Por lo tanto, las diferentes propiedades descritas para la mutante *bap1* y la mutante MMY2/H3/LT1, pueden deberse al diferente contenido genético de las cepas y/o a las diferentes condiciones experimentales. Alternativamente, el gen *BAP1* puede no ser alélico a *LET1* o *LET2*. Recientemente, Jørgensen y col. (1997) han demostrado que el gen *BAP1*, no es el gen estructural de una permeasa, sino que afecta la incorporación de un amplio rango de aminoácidos, incluyendo fenilalanina, triptofano y tirosina. La secuenciación del gen *BAP1* mostró identidad al previamente caracterizado gen *STP1*. La proteína STP1 participa en el splicing de cinco familias de pre-RNAt (Wang y Hopper, 1988).

El cruce de la cepa MMY2/H3/LT1 x KE3-R23 permitió, luego de la esporulación de la diploide (homocigota para la mutación *gap1*), el estudio del transporte de los aminoácidos de cadena ramificada en las tetradas.

Los ensayos de entrada e incorporación de L-leucina (Figuras V. 1 - V. 5 y Tablas V. 1 y V. 2), junto con las determinaciones de los parámetros cinéticos en las haploides de las tetradas correspondientes a cada tipo: parental, no parental y tetratipo (Tabla V. 3 y Figuras V. 6 - V. 8), indicaron una segregación 2:2 del gen *LET1*, en cada una de los tres tipos de tetradas, ya que hay dos haploides en las que se detecta el sistema S1 de alta afinidad-baja velocidad y que son sensibles a TFL y otras dos, en las que no se lo detecta debido a la presencia de la mutación *let1*, confirmando que la pérdida de actividad del sistema S1 está ligada al desarrollo del componente mayor de resistencia a TFL.

Los resultados con respecto a la mutación *let2* no fueron tan simples, una mutación no condujo a una única modificación del sistema S2. La interpretación de los resultados con respecto a la segregación del gen *LET2*, sugieren la presencia de una tercera mutación en la cepa MMY2/H3/LT1 que podría interferir con la incorporación de leucina por el sistema S2 o, alternativamente, de alguna interacción entre los productos de los genes *LET1* y *LET2*. Así, en la tetrada KE5-3, parental por el análisis de resistencia a TFL, las cuatro haploides presentan valores de K_T similares a los del sistema S2, mientras que los valores de $J_{m\acute{a}x}$ son: en las cepas 3A y 3B (sensibles a

- 4) el transporte de leucina por el sistema S2, es inhibido significativamente (40-93%), además de los aminoácidos señalados en el punto anterior, por aspartato, glutamato, alanina, triptofano, serina, treonina, tirosina, glutamina, asparagina y α -aminobutirato; lisina, arginina, histidina y D-leucina causaron un efecto limitado (20-30%).
- 5) el transporte de leucina por el sistema de baja afinidad-baja capacidad identificado en la mutante MMY2/H3/LT1, presenta similares perfiles de inhibición que el sistema S2 de baja afinidad-alta capacidad identificado en la cepa KE5-3C.
- 6) el transporte de L-leucina por el sistema S2, independientemente de su capacidad, es inhibido diferencialmente por TFL; a bajas concentraciones de leucina, TFL no inhibe su transporte, reflejando la pérdida de actividad de la permeasa S1 y, a altas concentraciones de leucina, TFL causa una inhibición del 40%.

De acuerdo a la especificidad del sistema S1, los datos obtenidos en la cepa KE3-R23, de la inhibición del transporte de L-¹⁴C-leucina 0,05 mM por alanina, treonina, serina y asparagina (40-55%), indican una contribución del sistema S2 a los valores del transporte de leucina determinados a baja concentración de la misma (Tabla III. 8).

En conclusión, el sistema de alta afinidad-baja capacidad, S1, identificado en la cepa KE5-17B, tiene una especificidad restringida a un grupo de α -aminoácidos hidrofóbicos de configuración L, siendo la excepción la cisteína, que posee un grupo sulfhidrilo que le confiere polaridad. Estos resultados se correlacionan con el sistema LUP1 de transporte de aminoácidos hidrofóbicos descrito por Heinemann y col. (1994), con la salvedad que esos autores no ensayaron la inhibición del transporte de leucina por cisteína. En contraste, el sistema de baja afinidad-alta capacidad, S2, identificado en la cepa KE5-3C, es de amplia especificidad, poniendo de manifiesto la semejanza con la GAP1; sin embargo, a diferencia de ésta, no transporta significativamente lisina, arginina e histidina.

La limitada capacidad de transporte de la permeasa S1 (codificada por el gen *LET1*) en la cepa 17B *gap1let2*, se refleja en la disminuída utilización de los aminoácidos de cadena ramificada, metionina y fenilalanina, como fuentes individuales de nitrógeno, en medio mínimo sólido (Tabla V. 11). Más aún, la inhibición del crecimiento de las cepas *gap1* y *gap1let2*, en presencia del análogo tóxico de fenilalanina, β -2-tienilalanina, en contraste con la resistencia observada en las cepas *gap1let1* y *gap1let1let2*, confirman que la resistencia a este análogo, está ligada a la

mutación *let1*. Por consiguiente, la fenilalanina es transportada por el sistema S1 de alta afinidad-baja capacidad (Tabla V. 12). El resultado más sorprendente es la ausencia de crecimiento de esta cepa sobre treonina y serina y que, junto a la ausencia de inhibición sobre el transporte de leucina, indican que el producto codificado por el gen *LET1*, no se requiere para el transporte de serina y treonina (Tabla V. 11).

En contraste, la sola presencia del sistema S2, de baja afinidad-alta capacidad (cepa 3C), permite el crecimiento sobre todas las fuentes de nitrógeno investigadas; los ensayos de crecimiento sugieren que el gen *LET2* codifica un componente (S2) necesario para el transporte, no sólo de los aminoácidos de cadena ramificada, sino también de serina y treonina, así como de metionina, fenilalanina y norleucina (Tabla V. 11). Además, la cepa 3C es sensible a la presencia en el medio de cultivo de L-etionina y azaserina, análogos tóxicos de metionina y serina respectivamente; el mismo fenotipo fue observado en las cepas en que operan los sistemas S1 y S2 ó sólo el sistema S1. Sin embargo, las cepas (MMY2/H3/LT1 *gap1let1let2* ó 3D y 17D) en que opera el sistema S2 con baja velocidad son completamente resistentes, sugiriendo la presencia de una tercera mutación en adición a *let1* y *let2* (Tabla V. 12).

A este respecto, Gits y Grenson (1967) y Kotyk y col. (1971), demostraron la existencia de dos componentes para el transporte de L-metionina, uno de alta afinidad ($K_T = 3-12 \mu\text{M}$) y otro de baja afinidad ($K_T = 0,6-0,8 \text{ mM}$). El sistema de alta afinidad es específico para L-metionina y sus análogos L-etionina y DL-selenometionina. Gits y Grenson (1967), sugirieron que el sistema de baja afinidad podría transportar además L-serina y L-treonina. Más recientemente, Isnard y col. (1996), demostraron que L-metionina es transportada por tres diferentes permeasas: una permeasa de alta afinidad ($K_T = 13 \mu\text{M}$) codificada por el gen *MUP1*, una permeasa de baja afinidad ($K_T = 0,2 \text{ mM}$) y otra permeasa de muy baja afinidad ($K_T = 1 \text{ mM}$) codificada por el gen *MUP3*. La especificidad del transporte de L-metionina en una cepa con una doble interrupción (*mup1::HIS3*, *mup3::LEU2*) que solamente expresa la permeasa de baja afinidad, mostró que la misma, exhibe amplia especificidad de sustrato, siendo fuertemente inhibida por L-etionina, L-leucina, L-treonina, L-fenilalanina y L-histidina. La K_i por leucina fue de 0,30 mM y por histidina de 0,79 mM.

Teniendo en cuenta los resultados de Gits y Grenson (1967), de Isnard y col. (1996), y los de este trabajo, es altamente probable que el producto codificado por el gen *LET2* esté relacionado con el sistema de transporte de metionina de baja afinidad.

Los ensayos de incorporación de L-isoleucina y L-valina en las tetradas (Figuras VI. 1 -VI. 5, Tablas VI.1 y VI. 2), así como los experimentos de competencia (Tablas VI. 3 - VI. 5), mostraron características y patrones similares a los de L-leucina. Las cinéticas de transporte de isoleucina y valina en las cepas de la tetrada KE5-3 y en la cepa KE5-17B (Figuras VI. 6 -VI. 9), junto con la determinación de los parámetros cinéticos (Tablas VI.6 - VI. 7), permitieron demostrar que el transporte de estos aminoácidos es mediado por más de un sistema en la cepa parental KE3-R23 *gap1*

En la cepa KE5-17B *gap1let2*, cada aminoácido es transportado por un único sistema de alta afinidad-baja capacidad ($K_{T\text{ ile}} = 55 \mu\text{M}$ y $K_{T\text{ val}} = 80 \mu\text{M}$), inhibible por leucina, isoleucina, valina, metionina y TFL, pero no por alanina y treonina. Por otra parte, las cinéticas del transporte de leucina, isoleucina y valina, fueron ensayadas en presencia de cada uno de los otros dos aminoácidos como inhibidores. Las inhibiciones recíprocas fueron competitivas (Figuras VII. 1 - VII. 3) en todas las combinaciones, y los valores de K_T y K_i determinados para cada aminoácido de cadena ramificada (tomado como sustrato y como inhibidor, respectivamente) fueron muy similares (Tabla VII. 1).

Por lo tanto, estos resultados confirman que los aminoácidos de cadena ramificada son transportados por una permeasa común, S1, de alta afinidad-baja capacidad, codificada por el gen *LET1*. Además, el transporte de leucina es inhibido competitivamente por metionina, TFL y norleucina.

De acuerdo a los datos presentados en la Tabla VII. 4, las velocidades iniciales de transporte de los aminoácidos de cadena ramificada por el sistema S1, son similares en los medios YPD y MP y levemente inferiores en el medio MA. Así, el gen *LET1* y su producto la permeasa S1, no están sujetas a la represión catabólica y a la inactivación catabólica por nitrógeno, respectivamente.

En la cepa KE5-3C *gap1let1*, isoleucina y valina son transportados por un único sistema de baja afinidad-alta capacidad ($K_{T\text{ ile}} = 0,33 \text{ mM}$ y $K_{T\text{ val}} = 0,45 \text{ mM}$), inhibible por leucina, isoleucina, valina, alanina, metionina, treonina y TFL. Por otra parte, en la cepa KE5-3C, el transporte de leucina por el sistema S2, es inhibido competitivamente por cada uno de los otros dos aminoácidos de cadena ramificada y también por

metionina, norleucina y TFL (Figura VII. 4). Los valores de las K_i son similares o aún menores ($K_{i_{ile}} = 0,25$ mM, $K_{i_{val}} = 0,44$ mM) que el valor de K_T (0,32 mM) para el transporte de leucina, con excepción de la K_i por TFL con un valor de 4,44 mM revelando una muy baja afinidad por el sistema S2 (Tabla VII. 2), Además, los valores de K_i de isoleucina y valina son similares a los valores de K_T para su propio transporte. Por otra parte la actividad de transporte de L-leucina por el sistema S2 es inhibida en más del 50%, cuando las células son precargadas con los mismos aminoácidos que inhibieron su transporte en los ensayos de competencia.

Por lo tanto, teniendo en cuenta las determinaciones cinéticas, los ensayos de inhibición y de crecimiento, el sistema S2 transporta no sólo los aminoácidos de cadena ramificada, sino también metionina, serina y treonina. No se puede descartar que otros aminoácidos (glutamina, asparagina, glutamato, aspartato, alanina, triptofano, tirosina, fenilalanina y α -aminobutirato) que inhiben el transporte de leucina por el sistema S2 sean también sustratos de este sistema. Sin embargo, la cepa KE5-17B en la que no se detecta el sistema S2 (mutación *let2*), crece bien con esas fuentes de nitrógeno, indicando que el sistema S2 no es indispensable para el transporte de esos aminoácidos. Las inhibiciones observadas se podrían explicar en términos de competencia de cada uno de estos aminoácidos por un factor de energía presente en cantidades finitas, necesario para su propio transporte, afectando de esta manera la actividad del transporte de leucina.

Con respecto a la regulación del sistema S2 que exhibe la cepa 3C, por la fuente de nitrógeno presente en el medio de cultivo, los resultados son diferentes de aquellos obtenidos para el transporte de leucina e isoleucina en las cepas *gap1* MMY2/H3 y KE3-R23 que, como ya se ha dicho, resultan fuertemente disminuidos en células crecidas en medio MA con respecto a aquellas provenientes del medio MP. En células de la cepa 3C crecidas tanto en medio MP como en medio MA, el transporte de los aminoácidos de cadena ramificada por el sistema S2 fue siempre mucho mayor que los valores obtenidos en la cepa parental KE3-R23. Teniendo en cuenta el total de los datos experimentales presentados en este trabajo, la actividad de transporte de los aminoácidos de cadena ramificada por el sistema S2, no es controlada solamente por el producto del gen *LET2*, la presencia de una tercera mutación además de *let1* y *let2* en la cepa MMY2/H3/LT1 explicaría las diferencias observadas en las tetradas.

Grauslund y col. (1995), han aislado y secuenciado un gen designado *BAP2*, que codifica una permeasa para aminoácidos de cadena ramificada en *S. cerevisiae*.

Este gen fue identificado por su capacidad en múltiples copias, de aumentar el crecimiento de una mutante defectiva en la biosíntesis de leucina, en un cultivo limitado en isoleucina (20 μ M). En una cepa $\Delta gap1$, la supresión de *BAP2* redujo el transporte de leucina y valina en 45% y el transporte de isoleucina en 25%, el transporte remanente de los aminoácidos de cadena ramificada se produce por una ó más permeasas. El transporte de otros aminoácidos, como serina, alanina, metionina, fenilalanina, tirosina e histidina, no fue afectado por la supresión de *BAP2* y el transporte de triptofano y glutamato aumentó en 50%. Una copia extra del gen *BAP2* en la cepa control $\Delta gap1BAP2$, incrementó en un 40-50% el transporte de leucina y valina, en un 25% el transporte de fenilalanina y un aumento menor en el transporte de isoleucina, triptofano y metionina.

La permeasa *BAP2* podría corresponder a uno de los dos sistemas de transporte de aminoácidos de cadena ramificada S1 ó S2, cinéticamente caracterizados, descritos en esta tesis. Las diferentes condiciones experimentales usadas por Grauslund y col. (1995) y las nuestras, dificultan comparar los resultados en términos de esta cuestión. Por ejemplo, nosotros medimos el transporte de los aminoácidos de cadena ramificada por el sistema S1 en amortiguador FHK, utilizando una concentración de 0,05 mM para cada aminoácido, mientras que Grauslund y col., miden el transporte de los mismos en medio mínimo conteniendo, no sólo iones amonio, sino también una mezcla de 14 aminoácidos incluyendo 0,23 mM de leucina, 0,23 mM de isoleucina, 0,26 mM de valina, 0,30 mM de fenilalanina y 0,40 mM de metionina. Puede ser considerada la posibilidad que con una concentración 5 veces mayor que la concentración usada para distinguir cinéticamente el sistema S1 del S2, el transporte por este último sistema tenga una contribución sustancial en los valores de entrada.

Sin embargo, a pesar de estas diferencias, la aparente alta especificidad de la permeasa *BAP2* por los aminoácidos de cadena ramificada, permite sugerir que el gen *BAP2* es alélico al gen *LET1*, más que al gen *LET2*, que como muestran los datos de esta tesis, es menos específico.

En efecto, trabajos en curso realizados en la cepa MMY2/H3/LT1 *gap1let1let2* transformada con el plásmido conteniendo el gen *BAP2*, muestran un aumento en el

transporte de leucina medido a bajas concentraciones y se recupera la actividad del sistema S1 de alta afinidad-baja capacidad para el transporte de aminoácidos ramificados, en células crecidas en medio MA, confirmando que el gen *LET1* es alélico al gen *BAP2*. La presencia del gen *BAP2* no modificó los valores de entrada de L-leucina cuando las células crecieron en medio MP con respecto a los valores obtenidos en las células no transformadas.

A este respecto, recientemente Schreve y Garrett (1997), aislaron en forma independiente el gen *BAP2* como un supresor en múltiples copias, del fenotipo de no crecimiento en medio YPD de la cepa *aat1leu2* (Garrett, 1989). Esos autores demostraron, por análisis cinético de cepas con y sin la permeasa BAP2, que BAP2 es la permeasa de leucina de alta afinidad, S1, con un valor de $K_T = 37 \mu\text{M}$, similar al descrito para la permeasa S1 por Ramos y col. (1977, 1979, 1980), Stoppani y Ramos, (1978) y Kotliar y col. (1994) y a los presentados en este trabajo.

Una segunda permeasa de leucina, denominada Unk1 en sus estudios, es de baja afinidad con un valor de $K_T = 0,58 \text{ mM}$, que es del orden de los valores presentados para el sistema S2 (Ramos y col., 1977, 1979, 1980; Stoppani y Ramos, 1978) y en las cepas MMY2/H3 *gap1* (Kotliar y col., 1994), KE3-R23 *gap1*, MMY2/H3/LT1 *gap1let1let2* y KE5-3C *gap1let1*. Para determinar si BAP2/LET1, S2/Unk1 y GAP1 son las únicas permeasas que participan en el transporte de leucina en *S. cerevisiae*, Schreve y Garrett (1997), construyeron una cepa $\Delta gap1\Delta bap2$ y analizaron las cinéticas de transporte de leucina. Ellos determinaron la presencia de otra permeasa denominada Unk2 de alta afinidad, de pequeña contribución al transporte de leucina, en comparación a los principales transportadores BAP2/LET1 y S2/Unk1 en ausencia de actividad de la GAP1.

Las mayores diferencias se encontraron en los valores de $J_{\text{máx}}$ descritos en el trabajo de Schreve y Garrett (1997), por una lado y los de esta tesis y el trabajo de Kotliar y col. (1994), por el otro y son probablemente el resultado del diferente contenido genético de las cepas y/o los diferentes medios usados para el crecimiento de las mismas.

Didion y col. (1996), mostraron que la L-leucina induce la transcripción del gen *BAP2*, aumentando el transporte de los aminoácidos de cadena ramificada por la permeasa BAP2 en medio MA, pero no en medio MP, y que también puede aumentar

los niveles de actividad de transporte de los aminoácidos de cadena ramificada por otra/s permeasa/s, tanto en medio MA como en medio MP.

Los experimentos descritos por Schreve y Garrett (1997), fueron realizados en una cepa auxótrofa para leucina y el medio de cultivo contenía leucina, induciendo la expresión de *BAP2* y resultando en altos valores de $J_{m\acute{a}x}$. Sin embargo, cepas *Leu⁺*, tienen también un transporte elevado de leucina, sugiriendo que esas cepas pueden ser constitutivamente inducidas para el transporte de leucina.

A diferencia de los resultados presentados por Didion y col. (1996), en nuestras cepas, la adición de leucina al medio de cultivo con iones amonio o prolina como fuentes de nitrógeno, no tiene ningún efecto sobre el transporte de aminoácidos de cadena ramificada. El uso de cepas de diferente origen genético puede llevar a la desaparición o al no reconocimiento de un determinado proceso regulatorio en levaduras, habiendo ejemplos de este tipo en las actividades de varias enzimas que participan en la asimilación de nutrientes nitrogenados (arginasa, ornitina carbamoiltransferasa, urea amidoliasa) y para la permeasa general de aminoácidos (Wiame y col., 1985).

En relación con el transporte de aminoácidos de cadena ramificada por el sistema S2, aminoácidos estructuralmente relacionados tienen frecuentemente permeasas estructuralmente relacionadas. La permeasa *BAP2/LET1* presenta un 84% de homología en la secuencia de aminoácidos con el producto codificado por el gen *PAP1* (Mai y Lipp, 1994; Nelissen y col., 1995), y difiere de *BAP2* en los extremos C- y N-terminal. Es muy probable que la otra permeasa de transporte de aminoácidos de cadena ramificada (S2) sea la codificada por el gen *PAP1*.

En conclusión, a partir de la cepa *MMY2/H3 gap1*, se ha identificado y caracterizado exhaustivamente el transporte de aminoácidos de cadena ramificada en una cepa mutante *TFL^R*, que no presenta actividad de transporte de leucina por el sistema S1 de alta afinidad y en la cual el transporte de los aminoácidos de cadena ramificada por el sistema S2 de baja afinidad, ha sido fuertemente reducido. Al menos dos genes controlan las actividades de esos sistemas y fueron designados *LET1* y *LET2* (leucine transport). Los estudios cinéticos, así como los de especificidad, de crecimiento y de regulación de la actividad de transporte, en las cepas llevando individualmente las mutaciones *let2* y *let1*, han permitido establecer que el producto

codificado por el gen *LET1/BAP2*, es el gen estructural de la permeasa S1 que transporta los aminoácidos de cadena ramificada con alta-afinidad.

Asímismo, se considera que la actividad de transporte de los aminoácidos de cadena ramificada y de serina, treonina y metionina por el sistema de baja afinidad S2 y amplia especificidad, es controlada y/o modulada por al menos dos genes: el gen *LET2* y otro gen cuya función debe ser establecida. Esperamos que los resultados presentados en este trabajo, así como los que podrán sucederlos, contribuyan al esclarecimiento de la multiplicidad y complejidad de los sistemas de transporte de aminoácidos, a través de la membrana plasmática en *S. cerevisiae*.

CONCLUSIONES

Los resultados descriptos, obtenidos en experimentos diseñados en cumplimiento de los objetivos propuestos, fueron discutidos y conclusiones parciales se presentaron en los Capítulos III-VII.

1- Se ha demostrado que el transporte de aminoácidos neutros de cadena ramificada L-isoleucina y L-valina es mediado por los sistemas de transporte GAP1, S1 y S2 cinéticamente caracterizados, previamente descriptos para L-leucina en *S. cerevisiae*, cepas silvestres y mutantes *gap1* defectivas en la actividad de la permeasa general de aminoácidos.

2- El transporte de L-isoleucina y L-valina mediado por la GAP1 es de alta afinidad y muy alta capacidad y contribuye en un 85-90% en la actividad total de transporte de ambos aminoácidos.

3- El gen *LET1/BAP2*, es el gen estructural de la permeasa S1 de alta afinidad-baja capacidad.

4- El gen *LET2* es un componente necesario para la óptima actividad del sistema S2 de baja afinidad-alta capacidad.

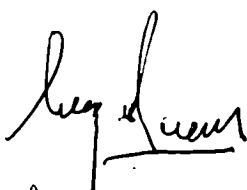
5- La permeasa S1 es de alta especificidad, media el transporte de los aminoácidos de cadena ramificada, de metionina y fenilalanina y del análogo tóxico trifluorleucina (TFL).

6- El sistema S2 es de amplia especificidad, media el transporte de los aminoácidos de cadena ramificada, metionina, fenilalanina, alanina, serina y treonina.

7- La actividad de la permeasa S1, no está sujeta a represión catabólica por nitrógeno (NCR), ni a la inhibición catabólica por nitrógeno (NCI).

8- La regulación de la actividad del sistema S2, por la fuente de nitrógeno presente en el medio de cultivo, en cepas que llevan la mutación *let1/bap2*, es diferente de la observada en ambas cepas parentales: *gap1* en la que el transporte es mediado por los

sistemas S1 y S2 y *gap1let1let2* en la que el transporte es mediado únicamente por el sistema S2 con baja capacidad. En células de las cepas *gap1let1* crecidas con iones amonio, el sistema S2 no está sujeto a la represión y/o inactivación catabólica por nitrógeno.


Prof. Dr. E. H. Ramos.
Prof. Dra. EUGENIA H. RAMOS
INVESTIGADORA - CONICET

REFERENCIAS

REFERENCIAS

- André, B. (1990) *Mol. Gen. Genet.* **220**, 269.
- André, B. y Grenson, M. (1990) *Yeast.* **6**: S323.
- André, B. (1995) *Yeast.* **11**, 1575.
- André, B., Hein, C., Grenson, M. y Jauniaux, J.-C. (1993) *Mol. Gen. Genet.* **237**, 17.
- Baichwal, V. R., Cunningham, T. S., Gatzek, P. R. y Kohlhaw, G. B. (1983) *Curr. Genetics.* **7**, 369.
- Ballarin-Denti, A., den Hollander, J. A., Sanders, D., Slayman, C. W. y Slayman, C. L. (1984) *Biochim. Biophys. Acta.* **778**, 1.
- Banerjee, S., Getz, G. S. y Garg, M. (1984) *J. Bacteriol.* **158**, 94.
- Barnett, J. A. (1976) en *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry* (R.S. Tipson y D. Horton, ed.), vol. 32, págs. 125-234, Academic Press, New York.
- Bauer, A. y Kölling, R. (1996) *Yeast.* **12**, 965.
- Bermúdez Moretti, M. (1994) Tesis Doctoral.
- Bongioanni, L. C. de. y Ramos, E. H. (1988) *Rev. Arg. Microbiol.* **20**, 1.
- Bowman, B. J., Mainzer, S. E., Allen, K. E. y Slyman, C. W. (1978) *Biochim. Biophys. Acta.* **512**, 13.
- Bray, G. A. (1960) *Anal. Biochem.* **1**, 279.
- Bussey, H. y Umbarger, H. E. (1970a) *J. Bacteriol.* **103**, 277.
- Bussey, H. y Umbarger, H. E. (1970b) *J. Bacteriol.* **103**, 286.
- Bysani, N., Rai, R., Daugherty, J. R. y Cooper, T.G. (1990) *Yeast.* **6**, S237.
- Calderbank, J., Keenan, M. H. J., Rose, A. H. y Holman, G. D. (1984) *J. Gen. Microbiol.* **130**, 2817.
- Calderbank, J., Keenan, M. H. J. y Rose, A. H. (1985) *J. Gen. Microbiol.* **131**, 57.
- Cartwright, C. P., Rose, A. H., Calderbank, J. y Keenan, M. H. J. (1989) *The Yeast* (A.H. Rose y J.S. Harrison, eds.), vol.3, págs. 5-56. Academic Press, Londres y Nueva York.
- Chan, P. Y. y Cossins, E. A. (1976) *J. Cell. Comp. Physiol.* **17**, 311.
- Christensen, H. N. J. (1985) *J. Membr. Biol.* **84**, 97.
- Cid, A. y Serrano, R. (1988) *J. Biol. Chem.* **263**, 14134.
- Collander, R., Turpeinen, O. y Fabritius, E. (1931) *Protoplasma.* **13**, 348.

- Cooper, T. G. (1982) en *The Molecular Biology of the Yeast Saccharomyces cerevisiae* (Strathern, J. N., Jones, E. W. y Broach, J.R. eds.), pág. 39-99, Cold Spring Harbor Laboratory, New York.
- Cooper, T. G., Ferguson, D., Rai, R. y Bysani, N. (1990) *J. Bacteriol.* **172**, 1014.
- Coornaert, D., Vissers, S. y André, B. (1991) *Gene.* **97**, 163.
- Coschigano, P. W. y Magasanik, B. (1991) *Mol. Cell. Biol.* **11**, 822.
- Courchesne, W. E. y Magasanik, B. (1983) *Mol. Cell. Biol.* **3**, 672.
- Crabeel, M. y Grenson, M. (1970) *Eur. J. Biochem.* **14**, 197.
- Darte, C. y Grenson, M. (1975) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **67**, 1028.
- de la Peña, P., Barros, F., Gascón, S., Ramos, S. y Lazo, P. S. (1982) *Eur. J. Biochem.* **123**, 447.
- Delhez, J., Dufour, J. P. y Goffeau, A. (1977) *Eur. J. Biochem.* **79**, 319.
- Didion, T., Grauslund, M., Kielland-Brandt, M. C. y Andersen, H. A. (1996) *J. Bacteriol.* **178**, 2025.
- Dubois, E. y Grenson, M. (1979) *Mol. Gen. Genet.* **175**, 67.
- Dubois, E., Vissers, S., Grenson, M. y Wiame, J.-M. (1977) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **75**, 233.
- Dufour, J. P y Goffeau, A. (1980) *Eur. J. Biochem.* **105**, 145.
- Dufour, J. P., Boutry, M. y Goffeau, A. (1980) *J. Biol. Chem.* **255**, 5735.
- Durr, M., Urech, K., Boller, T., Wiemken, A., Schwencke, J. y Nagy, M. (1979) *Arch. Microbiol.* **121**, 169.
- Eddy, A. A. (1982) *Adv. Microb. Physiol.* **23**, 11.
- Eddy, A. A. y Nowacki, J. A. (1971) *Biochem. J.* **122**, 701.
- Eddy, A. A., Indge, K. J., Backen, K. y Nowacki, J. A. (1970 a) *Biochem. J.* **120**, 845.
- Eddy, A. A., Backen, K. y Watson, G. (1970 b) *Biochem. J.* **120**, 853.
- Eddy, A. A., Philo, R., Earnshaw, P. y Brocklehurst, R. (1977) en *Biochemistry of Membrane Transport* (Semeza, G. y Carafoli, E., eds). FEBS Symposium 42 pp 250-260 Springer-Verlag. Berlín.
- Ferreras, J. M., Iglesias, R. y Girbés, T. (1989) *Biochim. Biophys. Acta.* **979**, 375.
- Gancedo, C y Serrano, R. (1989) *The Yeast*, (Rose, A. H. y Harrison, J. R. eds.), vol. 3, pág. 205-259. Academic Press, Londres y Nueva York.
- Garrett, J. M. (1989) *J. Gen. Microbiol.* **135**, 2429.

- Gits, J. J. y Grenson, M. (1967) *Biochim. Biophys. Acta.* **135**, 507.
- Goffeau, A. y Slyman, C. W. (1981) *Biochim. Biophys. Acta.* **639**, 197.
- Grauslund, M., Didion, T., Kielland-Brandt, M. C. y Andersen, H. A. (1995) *Biochim. Biophys. Acta.* **1269**, 275.
- Greasham, R. L. y Moat, A. G. (1973) *J. Bacteriol.* **115**, 975.
- Gregory, M. E., Keenan, M. H. J. y Rose, A. H. (1982) *J. Gen. Microbiol.* **128**, 2557.
- Grenson, M. (1966) *Biochim. Biophys. Acta.* **127**, 339.
- Grenson, M. (1973) en *Genetics of industrial microorganisms.* (Vanek, Z., Hostalek, Z. y Cudlin, J. eds.), pág. 179-193, Academia, Prague.
- Grenson, M. (1983a) *Eur. J. Biochem.* **133**, 135.
- Grenson, M. (1983b) *Eur. J. Biochem.* **133**, 141.
- Grenson, M. (1992) en *Molecular Aspects of Transport Proteins*, pág. 219-245 (Elsevier Sciences Publishers B. V.)
- Grenson, M. y Acheroy, B. (1982) *Mol. Gen. Genet.* **188**, 261.
- Grenson, M. y Dubois, E. (1982) *Eur. J. Biochem.* **121**, 643.
- Grenson, M. y Hennaut, C. (1971) *J. Bacteriol.* **105**, 447.
- Grenson, M., Mousset, M., Wiame, J.-M. y Béchet, J. (1966) *Biochim. Biophys. Acta.* **127**, 325.
- Grenson, M., Crabeel, M., Wiame, J.M. y Béchet, J. (1968) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **30**, 414.
- Grenson, M., Hou, C. y Crabeel, M. (1970) *J. Bacteriol.* **103**, 770.
- Grenson, M., Muyldermans, F., Broman, K. y Vissers, S. (1987) *Life. Sci. Adv.* **6**, 35.
- Halvorson, H. O. y Cohen, G.N. (1958) *Ann. Inst. Pasteur.* **95**, 73.
- Hein, C., Springael, J.-Y., Volland, C., Haguenaer-Tsapis, R. y André, B. (1995) *Mol. Microbiol.* **18**, 77.
- Heinemann, J. A., Ankenbauer, R. G. y Horecka, J. (1994) *Microbiology.* **140**, 145.
- Hoerberichts, J. A., Hulsebos, T. H. J. M., Van Wezenbeek, P. M. G. F y Borst-Pauwels, G. W. F. H. (1980) *Biochim. Biophys. Acta.* **595**, 126.
- Hoffmann, W. (1985) *J. Biol. Chem.* **260**, 11831.
- Horák, J. (1986) *Biochim. Biophys. Acta.* **864**, 223.
- Horák, J. (1997) *Biochim. Biophys. Acta.* **1331**, 41.
- Horák, J. y Kotyk, A. (1986) *Biochim. Biophys. Acta.* **857**, 173.

- Horák, J. y Kotyk, A. (1993) *Biochem. Mol. Biol. Int.* **29**, 907.
- Horák, J. y Rihová, L. (1982) *Biochim. Biophys. Acta.* **691**, 144.
- Isnard, A-D., Thomas, D. y Surdin-Kerjan, Y. (1996) *J. Mol. Biol.* **262**, 473.
- Jauniaux, J. -C. and Grenson, M. (1990) *Eur. J. Biochem.* **190**, 39.
- Jauniaux, J. -C., Vandebol, M., Vissers, S., Broman, K. y Grenson, M. (1987) *Eur. J. Biochem.* **164**, 601.
- Joiris, C. R. y Grenson, M. (1969) *Arch. Int. Physiol. Biochim.* **77**, 154.
- Jørgensen, M. U., Gjermansen, C., Andersen, H. A. y Kielland-Brandt, M. C. (1997) *Curr. Genet.* **737**, en prensa.
- Keenan, M. H. J. y Rose, A. H. (1979) *FEMS Microbiol. Letters.* **6**, 133.
- Keenan, M. H. J., Rose, A. H. y Silverman, B. W. (1982) *J. Gen. Microbiol.* **128**, 2557.
- Kotliar, N. y Ramos, E. H. (1983) *Biochim. Biophys. Acta.* **734**, 378-.
- Kotliar, N., Stella, C. A. y Ramos, E. H. (1990) *Rev. Arg. Microbiol.* **22**, 7.
- Kotliar, N., Stella, C. A., Ramos, E. H. y Matton, J. R. (1994) *Cell. mol. Biol.* **40**, 833.
- Kotyk, A. y Rihová, L. (1972) *Biochim. Biophys. Acta.* **288**, 380.
- Kotyk, A., Ponec, M. y Rihová, L. (1971) *Folia Microbiologica.* **16**, 432.
- Kotyk, A., Michaljanicova, D., Struzinsky, R., Baryshnikova, L. y Sychrová, H. (1985) *Folia Microbiologica.* **30**, 110.
- Kovác, L., Böhmerová, E. y Necas, O. (1987) *Biochim. Biophys. Acta.* **899**, 265.
- Kreger-van Rij, N. J. W. (1984) *The Yeast, a Taxonomic Study*, Elsevier, Amsterdam.
- Lasko, P. F. y Brandriss, M. C. (1981) *J. Bacteriol.* **148**, 241.
- Lichko, L. P. y Okorov, L. A. (1984) *FEBS Lett.* **74**, 233.
- Ljungdahl, P. O., Gimeno, C.J., Styles, C.A. y FinK, G. R. (1992) *Cell.* **71**, 463.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N-J., Farr, A. L. y Randall, M. J. (1951) *J. Biol. Chem.* **193**, 265.
- Magaña-Schwencke, N. y Schwencke, J. (1969) *Biochim. Biophys. Acta.* **173**, 313.
- Magaña-Schwencke, N., Kuznar, J. y Schwencke, J. (1973) *Biochim. Biophys. Acta.* **318**, 281.
- Mai, B. y Lipp, M. (1994) *Gene.* **143**, 129.
- Malpartida, F. y Serrano, R. (1981a) *J. Biol. Chem.* **256**, 4175.
- Malpartida, F. y Serrano, R. (1981b) *FEBS Lett.* **131**, 351.

- McCusker, J. R. y Haber, J. E. (1990) *Mol. Cell. Biol.* **10**, 2941.
- Mitchell, P. (1963) *Biochem. Soc. Symp.* **22**, 142.
- Mitchell, A. P. y Magasanick, B. (1984) *Mol. Cell. Biol.* **4**, 2758.
- Nelissen, B., Mordant, P., Jonniaux, J-L., De Watcher, R. y Goffeau, A. (1995). *FEBS Lett.* **377**, 232.
- Novick, P., Osmond, B. C. y Botstein, D. (1989) *Genetics.* **121**, 659.
- Ono, B-I. y Naito, K. (1991) *Yeast.* **7**, 849.
- Opekarova, M., Kotyk, A., Horák, J. y Kolodenko, V. P. (1975) *Eur. J. Biochem.* **103**, 373.
- Opekarova, M., Caspari, T. y Tanner, W. (1993) *Eur. J. Biochem.* **211**, 683.
- Ohsumi, Y. y Anraku, Y. (1981) *J. Biol. Chem.* **256**, 2079.
- Peters, P. H. J. and Borst- Pauwels, G. W. F. H. (1979) *Physiologia Plantarum.* **46**, 330.
- Petrov, V. V., Smirnova, V. V. y Okorokov, L. A. (1992) *Yeast.* **8**, 589.
- Rai, R., Genbauffe, F.S., Lea, H. Z. y Cooper, T. G. (1987) *J. Bacteriol.* **169**, 3521.
- Rai, R., Genbauffe, F.S., Sumrada, R. A. y Cooper, T. G. (1989) *Mol. Cell. Biol.* **9**, 602.
- Ramos, E. H., Bongioanni de, L. C., Claisse, M. L. y Stoppani, A. O. M. (1975) *Biochim. Biophys. Acta.* **394**, 470.
- Ramos, E. H., Bongioanni, L. C. de., Cuesta Casado, M. C. y Stoppani, A. O. M. (1977) *Biochim. Biophys. Acta.* **467**, 220.
- Ramos, E. H., Bongioanni, L. C. de., Stoppani, A. O. M. y Kurlat, I. (1979) *Rev. Asoc. Arg. Microbiol.* **10**, 102.
- Ramos, E. H., Bongioanni, L. C. de y Stoppani, A. O. M. (1980) *Biochim. Biophys. Acta.* **599**, 214.
- Ramos, E. H., Bongioanni, L. C. de., Wainer, S. R. y Stoppani, A. O. M. (1983) *Biochim. Biophys. Acta.* **731**, 361.
- Ramos, F., El Guezzar, M., Grenson, M. y Wiame, J-M. (1985) *Eur. J. Biochem.* **149**, 401.
- Ramos, S., Schuldiner, S. y Kaback, H. R. (1976) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **73**, 1892.
- Riemersma, J.C. y Alsbach, E. J. J. (1974) *Biochim. Biophys. Acta.* **339**, 274.
- Roon, R. J., Levy, J. S. y Larimore, F. S. (1977a) *J. Biol. Chem.* **252**, 3599.

- Roon, R. J., Meyer, J. M. y Larimore, F. S. (1977b) *Mol. Gen. Genet.* **158**, 185.
- Rytka, J. (1975) *J. Bacteriol.* **121**, 562.
- Sáenz, D. A. (1995) Tesis Doctoral.
- Sáenz, D. A., Chianelli, M. S., Stella, C. A., Mattoon, J. R. y Ramos, E. H. (1997) *Int. J. Cell. Biol.* **29**, 505.
- Sato, T., Oshumi, Y. y Anraku, Y. (1984a) *J. Biol. Chem.* **259**, 11505.
- Sato, T., Oshumi, Y. y Anraku, Y. (1984b) *J. Biol. Chem.* **259**, 11509.
- Schatz, G., Penefsky, H. S. Racker, D. (1967) *J. Biol. Chem.* **242**, 2552.
- Scherrer, R., Loudon, L. y Gerhardt, P. (1974) *J. Bacteriol.* **118**, 534.
- Schmidt, A., Hall, M. N. y Koller, A. (1994) *Mol. Cell. Biol.* **14**, 6597.
- Schreve, J. y Garrett, J. M. (1997) *Yeast.* **13**, 435.
- Schwencke, J., Fariás, G. y Rojas, M. (1971) *J. Biochem.* **21**, 137.
- Seaston, A., Carr, G. y Eddy, A. A. (1976) *Biochem. J.* **154**, 669.
- Serrano, R. (1978) *Mol. Cell. Biochem.* **22**, 51.
- Serrano, R. (1980) *Eur. J. Biochem* **105**, 419.
- Sigler, K., Knotková, A. y Kotyk, A. (1978) *Folia Microbiol.* **23**, 409.
- Sigler, K., Knotková, A. y Kotyk, A. (1981) *Biochim. Biophys. Acta.* **643**, 572.
- Singer, S. J. y Nicolson, G. L. (1972). *Science.* **175**, 720.
- Sorsoli, W. A., Spence, K. D. y Parks, L. W. (1964) *J. Bacteriol.* **88**, 20.
- Stanbrough, M. y Magasanik, B. (1995) *J. Bacteriol.* **177**, 94.
- Stanbrough, M. y Magasanik, B. (1996) *J. Bacteriol.* **178**, 2465.
- Stella, C. A. (1990) Tesis Doctoral.
- Stella, C. A., Kotliar, N., Sáenz, D. A., Bongioanni, L. C. de. y Ramos, E. H. (1992) *Anales Asoc. Quím. Arg.* **80**, 261.
- Stella, C. A., Korch, C., Ramos, E. H. y Mattoon, J. R. (1995) XVII International Conference on Yeast Genetics and Molecular Biology. *Yeast Special issue.* **11**, S460.
- Stoppani, A. O. M. y Ramos, E. H. (1978) en *Biochemistry of Yeast.* (Bacila, M., Horecker, B. y Stoppani, A. O. M., eds.) pp. 171-196, Academic Press, New York.
- Stratford, M. y Rose, A. H. (1986) *J. Gen. Microbiol.* **132**, 1.
- Suomalainem, H. (1968) en *Aspects of yeast metabolism.* pág 1-29. (A. K. Mills. ed.) Blackwell Scientific Publications, Oxford and Edinburgh.

- Surdin, Y., Sly, W., Sire, J., Bordes, A. M. y De Robichon- Szulmajster, H. (1965) *Biochim. Biophys. Acta.* **107**, 546.
- Sychrová, H. y Chevallier, M. R. (1993) *Yeast.* **9**, 771.
- Sychrová, H. y Kotyk, A. (1985) *FEBS Lett.* **183**, 21.
- Sychrová, H., Horák, J. y Kotyk, A. (1989) *Yeast.* **5**, 199.
- Tanaka, J. y Fink, G. R. (1985) *Gene.* **38**, 205.
- Tullin, S., Gjermansen, C. y Kielland-Brandt, M. C. (1991) *Yeast.* **7**: 933-941.
- Vandebol, M., Jauniaux, J. -C. y Grenson, M. (1989) *Gene.* **83**: 153-159.
- Vandebol, M., Jauniaux, J. -C. y Grenson, M. (1990) *Mol. Gen. Genet.* **222**: 393-399.
- Van der Rest, M. E., Kamminga, A. H., Nakano, A., Anraku, Y., Poolman, B. y Konings, W. N. (1995) *Microbiological Reviews.* **59**, 304.
- Van der Wilden, W. y Matilde, P. (1978) *Biochimie und Physiologie der Pflanzen.* **173**, 285.
- Vavra, J. J. y Jhonson, M. J. (1956) *J. Biol. Chem.* **220**, 33.
- Verma, R. S., Rao, T. V. G. y Prasad, R. (1984) *Biochim. Biophys. Acta.* **778**: 289.
- Villalobo, A. (1982) *J. Biol. Chem.* **257**, 1824.
- Villalobo, A., Boutry, M. y Goffeau, A. (1981) *J. Biol. Chem.* **256**, 12081.
- Vissers, S., André, B., Muyledermans, F. y Grenson, M. (1989) *Eur. J. Biochem.* **181**, 357.
- Vissers, S., André, B., Muyledermans, F. y Grenson, M. (1990) *Eur. J. Biochem.* **187**, 611.
- Vorisek, J. (1972) *Biochim. Biophys. Acta.* **290**, 256.
- Wainer, S. R., Boveris, A. y Ramos, E. H. (1988) *Arch. Biochem. Biophys.* **262**, 481.
- Wang, S. S. y Hopper, A. K. (1988) *Mol. Cell. Biol.* **8**, 5140.
- Wiame, J-M., Grenson, M. y Arst, H. N., Jr. (1985) *Adv. Microb. Physiol.* **26**, 1.
- Wickerham, L. J. (1951) *Taxonomy of yeast. I Techniques classification.* U. S. Dept. Agr. Tech. Bull. N° 1029.
- Wiemken, A. (1975) *Meth. Cell. Biol.* **12**, 99.
- Wills, C. (1990) *Biochem. Mol. Biol.* **25**, 245.
- Willsky, G. R. (1979) *J. Biol Chem.* **254**, 3326.
- Zhu, X., Garrett, J. M., Schreve, J. y Michaeli, T. (1996) *Curr. Genet.* **30**, 107.