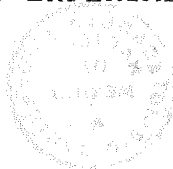


UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

TRANSPORTE DE AMINOACIDOS EN LEVADURAS Saccharomyces
cerevisiae. UN ESTUDIO EXPERIMENTAL Y SU ANALISIS
TERMODINAMICO.



TESIS

PARA OBTENER EL TITULO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS QUIMICAS (FISICOQUIMICA)

PRESENTA:

FROYLAN MIGUEL GOMEZ LAGUNAS.

MEXICO, D. F. 1986.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso


DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Este trabajo se realizó en el Instituto de Fisiología Celular y en la División de Estudios de Posgrado de la Facultad de Química, UNAM. Bajo la dirección de los Dres.- Antonio Peña Díaz y Auster Valderrama.

Dr. Antonio Peña Díaz



Dr. Auster Valderrama

Froylán Miguel Gómez Loguñas.
Biol. Froylán M. Gómez. L

Presidente: DR. ALBERTO DARSZON

1er. vocal: M.C. MATILDE MORENO

Secretario: DR. EDMUNDO CHAVEZ

Suplente: DR. EDGARDO ESCAMILLA

Suplente: DR. AUSTER VALDERRAMA

RESUMEN:

Se ha reportado que en las levaduras del género Saccharomyces, la entrada de aminoácidos se da a través de una permeasa general (PG) inhibible por NH_4^+ y permeasas específicas. La PG, se ha estudiado mediante el transporte de citrulina.

También se ha reportado, que ni el Na^+ , ni el K^+ juegan papel directo alguno en la captación de aminoácidos, a no ser el de balancear la carga eléctrica neta que cruza la membrana.

En este trabajo se muestra que:

1) La citrulina no inhibe el transporte de aminoácidos neutros, y su entrada presenta dos componentes cinéticos, uno de los cuales parece ser una permeasa de aminoácidos básicos.

2) La preincubación de las levaduras con K^+ estimula el transporte de aminoácidos, y puede anular la inhibición del NH_4^+ . Este proceso tiene un curso temporal largo, requiere síntesis de proteínas y es independiente del pH.

La activación por K^+ , se representó en una gráfica de unión que describe la cinética de Michaelis del transporte de aminoácidos.

Los resultados presentados, muestran que: a) el esquema cinético de una PG y permeasas específicas, no es común a todas las cepas de levaduras, b) el K^+ desempeña un papel importante incrementando la captura de aminoácidos.

SUMMARY:

It has been reported that in yeast cells of the genus Saccharomyces, aminoacid uptake takes place through a general permease (GP) inhibited by NH_4^+ , and specific permeases. The GP activity, has been studied by measuring citruline transport.

It has been reported that neither Na^+ nor K^+ play any direct role in aminoacid transport, but only as a means to neutralize the electrical charge flowing through the membrane.

In this work we show that:

1) Citruline uptake has two kinetic components, one of them seems a basic aminoacids permease; citruline, on the other hand, does not inhibits neutral aminoacid transport activity.

2) Yeast preincubation with K^+ , greatly enhances the uptake and relieves the inhibition carried out by NH_4^+ . This process has a long time course, requires protein synthesis and is pH-independent.

With the purpose to have a model for further studies, the process of K^+ activation was introduced into a bond-graph that describes the Michaelis kinetics of the transport.

The results presented here, show that, a) the kinetic model based on a general permease plus specific permeases, does not work for all yeast strains, b) K^+ plays an important role on the aminoacid uptake, greatly enhancing its transport.

I N D I C E

Lista de Símbolos.....	0
Introducción:	
I. Generalidades.....	1
II. Termodinámica de Circuitos.....	3
III. Transporte en levaduras del género.....	
<u>Saccharomyces</u>	17
Objetivos.....	36
Materiales y Métodos.....	38
Resultados.....	45
Análisis Teórico. Gráficas de Unión.....	70
Discusión.....	91
Bibliografía.....	98

LISTA DE SIMBOLOS

- TEA = Trietanol Amina
- CH - Cicloheximida
- MES - Acido 2 (N-Morfolino) Etano Sulfónico
- HEPES- Acido N-2-Hidroxietyl Piperazina N-2-
Etanosulfónico.
- TRIS = Tris (Hidroximetil) Aminometano.

Introducción

I. Generalidades:

El estado actual del conocimiento biológico, muestra sin lugar a dudas que los procesos de transporte a través de membranas son uno de los mecanismos centrales de la fisiología celular. Así, fenómenos tan variados como la síntesis de ATP, la captación de nutrientes, la movilidad celular, la transmisión de mensajes en el sistema nervioso, la contracción muscular etc; se deben en última instancia al flujo de alguna especie química a través de una membrana (1, 2).

De lo anterior resulta clara la importancia que tanto para el conocimiento biológico como para el desarrollo de biotecnología, tiene el lograr un entendimiento cada vez más a fondo de estos procesos.

El estudio fenomenológico del transporte a través de membranas se efectúa analizando los aspectos cinéticos y energéticos del mismo. La cinética del transporte, generalmente se estudia una vez que el sistema ha alcanzado el estado estacionario; el aspecto energético del proceso, por otro lado, suele analizarse dentro del marco de la termodinámica clásica, la cual como es bien conocido, trata únicamente con los estados de equilibrio inicial y final de los sistemas. Así, al quedar excluida la variable tiempo, este procedimiento presenta la limitación de no considerar la información derivada del proceso en sí; esto es, no toma en cuenta lo que sucede mientras el sistema atraviesa por la sucesión temporal de estados de no-equilibrio que

constituyen el transporte. En este sentido, se logra una mejor descripción cuando el análisis se realiza dentro del esquema de la termodinámica de procesos irreversibles. Esta disciplina constituye una extensión de la Termodinámica Clásica, basada en la consideración de sistemas que se encuentran fuera del equilibrio y de los procesos temporales (irreversibles) asociados con dichos sistemas.

A la fecha, la termodinámica irreversible se encuentra más desarrollada en lo que concierne al tratamiento de procesos que se encuentran cerca del equilibrio, para los que los flujos se pueden escribir como una combinación lineal de las fuerzas. Dentro de esta región lineal, existe un resultado muy importante, a saber, las conocidas relaciones recíprocas de Onsager. Estas establecen, en ausencia de campos magnéticos y fuerzas de coriolis, la simetría de la matriz de coeficientes fenomenológicos; la importancia de este teorema radica en que reduce a la mitad el número de parámetros a medir.

La limitación de tal enfoque en el campo del transporte biológico radica, por un lado, en que muchas veces este se halla acoplado directamente a una reacción química cuyo flujo reactivo (velocidad de reacción) suele caer fuera de la región lineal, lo que dificulta su estudio; por otro lado, los flujos y fuerzas derivados de la función de disipación, en ocasiones son difíciles de medir en forma directa, por lo que es necesario transformar esta función (3). Así, aunque la termodinámica de procesos irreversibles

proporciona un marco conceptual adecuado para el estudio de los procesos de transporte, el análisis en ocasiones, no puede realizarse de manera directa.

En este contexto, en la década de los 70's Perelson, Oster y Katchalsky, establecieron una conexión entre la termodinámica de redes o circuitos y los elementos fundamentales de los sistemas biofísicos: acumulación o almacenamiento, procesos de flujo y reacciones químicas. El objetivo de esta conexión, fué obtener una técnica conveniente para la aplicación de la termodinámica al estudio de procesos biológicos.

II. Termodinámica de Circuitos:

A) Consideraciones formales.

El procedimiento de la termodinámica de circuitos, consiste en realizar una representación gráfica del sistema, junto con un algoritmo para obtener las ecuaciones dinámicas directamente de la gráfica (4, 5). Para comprender esta formulación, es conveniente compararla con el procedimiento empleado en la termodinámica clásica.

En la termodinámica clásica, se parte de un espacio cuyas coordenadas son las variables extensivas S , V , N_i (entropía, volumen y número de moles). La 1ª ley de la termodinámica, define una función U (energía interna) en este espacio, la cual se conserva en un sistema aislado. En términos

matemáticos, U describe una superficie en dicho espacio dada por:

$$U = U(S, V, N_1, \dots, N_k)$$

La 2ª ley de la termodinámica, establece que los estados de equilibrio del sistema quedan determinados por la siguiente propiedad: El valor en el equilibrio de cualquier parámetro interno no-restringido, es tal que minimiza la energía para el valor dado de la entropía total (6).

Los potenciales termodinámicos son los componentes del gradiente de U :

$$\nabla U = \left(\frac{\partial U}{\partial S}, \frac{\partial U}{\partial V}, \frac{\partial U}{\partial N_1}, \dots, \frac{\partial U}{\partial N_k} \right) = (T, -P, \mu_1, \dots, \mu_k)$$

donde: T = Temperatura Absoluta, P = Presión, μ_i = Potencial Químico de i .

Las relaciones de Maxwell de estos potenciales, que desempeñan un papel práctico análogo al de las relaciones de Onsager en termodinámica irreversible, se obtienen a partir de la condición de simetría de la matriz Hessiana de U , dada por:

$$H(\underline{x}) = \left[D_{ij} U \right]_{i,j=1}^n$$

En la Termodinámica de Circuitos, la función fundamental es la potencia en vez de la energía, la cual puede expresarse de manera general como: $P = \sum e_i f_i$

donde:

e_i = esfuerzo o potencial

f_i = variable de flujo

por ejemplo, en la teoría de circuitos eléctricos:

$e = \Delta V =$ diferencia de potencial eléctrico

$f = I =$ corriente eléctrica = $\frac{dq}{dt}$

Las variables primitivas ahora son e_i y f_i ; a

partir de estas variables se definen las nuevas variables de estado:

$$q(t) \equiv q(0) + \int_0^t f(t) dt = \left\{ \begin{array}{l} \text{DESPLAZAMIENTO} \\ \text{GENERALIZADO} \end{array} \right\}$$

Y

$$p(t) \equiv p(0) + \int_0^t e(t) dt = \left\{ \begin{array}{l} \text{MOMENTO} \\ \text{GENERALIZADO} \end{array} \right\}$$

Por ejemplo, en un sistema mecánico:

$$f(t) = v = \frac{dx}{dt} = \left\{ \text{VELOCIDAD} \right\}$$

$$\Rightarrow x(t) = x(0) + \int_0^t f(t) dt = \left\{ \text{DESPLAZAMIENTO} \right\}$$

La 2ª ley de Newton, nos dice que:

$$F = \frac{dp}{dt} \quad \cdot \quad F = \left\{ \text{FUERZA} \right\} = e$$

$$p = \left\{ \text{momento} \right\} = mv \quad \circ \quad p(t) = p(0) + \int_0^t e(t) dt$$

Las interacciones del sistema determinan la forma particular de las relaciones entre las variables e , f , p , q . A cada forma de interacción del sistema con su ambiente se le denomina "entrada-energética". Asociado a cada entrada (1-entrada) hay un par de variables por ejemplo (e , f) cuya relación funcional determina el comportamiento de la entrada y por lo tanto del sistema, así, formalmente:

Definición.-

Una n-entrada es un mapeo G ó relación constitutiva que asigna al conjunto de n-variables independientes de la entrada, el conjunto correspondiente de n-variables conjugadas.

Ahora bien, con base en la expresión para la potencia, existen 4 posibles relaciones entre las 4 variables de estado, a saber:

- 1.- $\phi_C (e, q) = 0$ capacitiva
- 2.- $\phi_L (p, f) = 0$ inductiva
- 3.- $\phi_R (e, f) = 0$ resistiva
- 4.- $\phi_H (p, q) = 0$ memresistiva

Por ejemplo, para un condensador, se define la capacitancia

"C" como: $C = \frac{\Delta q}{\Delta V}$ DONDE: $\Delta q = \left\{ \begin{array}{l} \text{CARGA ELÉCTRICA} \\ \text{SEPARADA POR EL} \\ \text{CONDENSADOR} \end{array} \right\}$

$\Delta V = \left\{ \begin{array}{l} \text{DIFERENCIA DE} \\ \text{POTENCIAL ENTRE LAS} \\ \text{PLACAS DEL CONDENSADOR} \end{array} \right\}$ $\circ \circ \circ C \Delta V - \Delta q = 0 = \phi_C$

A partir de estas 4 relaciones, se tiene que hay 3 formas de integrar a "p":

$$1.- E_C(t) = E_C(0) + \int_{q(0)}^{q(t)} e(q) dq = \left\{ \begin{array}{l} \text{ENERGÍA} \\ \text{(CAPACITIVA)} \end{array} \right\}$$

$$2.- E_L(t) = E_L(0) + \int_{p(0)}^{p(t)} f(p) dp = \left\{ \begin{array}{l} \text{ENERGÍA} \\ \text{(CINÉTICA)} \end{array} \right\}$$

$$3.- E_D(t) = E_D(0) + \int_0^t e f dt = \left\{ \begin{array}{l} \text{ENERGÍA} \\ \text{DISIPADA} \end{array} \right\}$$

Por ejemplo, sabemos que la energía cinética de un cuerpo esta dada por:

$$E_C = \frac{1}{2} m v^2 = \int m v dv = \int v dp = \int f(p) dp$$

Donde: $dp = d(mv)$

Así mismo, a partir de las ecuaciones constitutivas se definen:

$$C \equiv \frac{\partial q}{\partial e} = \left\{ \begin{array}{l} \text{incremento} \\ \text{CAPACITIVO} \end{array} \right\}$$

$$L \equiv \frac{\partial p}{\partial f} = \left\{ \begin{array}{l} \text{incremento} \\ \text{INDUCTIVO} \end{array} \right\}$$

$$R \equiv \frac{\partial e}{\partial f} = \left\{ \begin{array}{l} \text{incremento} \\ \text{RESISTIVO} \end{array} \right\}$$

Por ejemplo, en una membrana de capacidad C_m

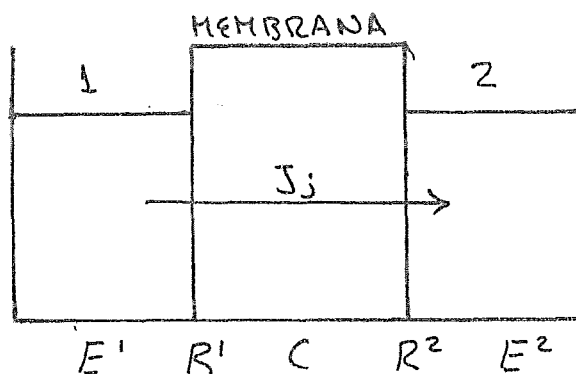
$$q = n_m = \left\{ \begin{array}{l} \# \text{ moles de una especie} \\ \text{DADA en la membrana} \end{array} \right\}$$

$$e = \mu_m = \left\{ \begin{array}{l} \text{Potencial Químico de la} \\ \text{especie en la membrana} \end{array} \right\}$$

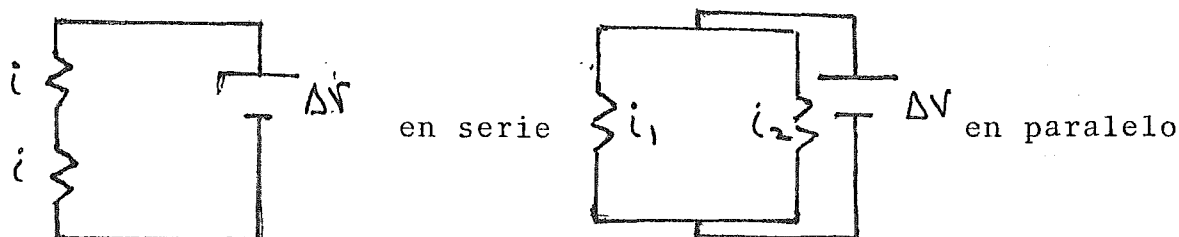
$$C_m = \frac{\partial n_m}{\partial \mu_m}$$

B) Representación Gráfica:

Para representar en forma gráfica los procesos que se dan en el sistema, se introducen los elementos ideales C, R, E, L, M estos elementos son generalizaciones de los conceptos eléctricos de capacitancia, resistencia, batería etc. por ejemplo, si tenemos una membrana separando 2 compartimentos entre los que se lleva a cabo la difusión de alguna sustancia "j", el centro de la membrana puede verse como un condensador en el que se da una acumulación local de "j"; si los compartimentos que separa la membrana son suficientemente grandes, podemos considerar que se encuentran a potencial (químico ó electroquímico) constante y por lo tanto pueden mirarse como baterías de potencial "E". Finalmente, el aspecto disipativo inherente al proceso de difusión, debe representarse mediante resistencias ubicadas en las interfases membrana-solución, esto es:



La unión de estos elementos, se realizará mediante "uniones energéticas" ideales (-), las cuales son generalizaciones de conductores perfectos, esto es que transmiten potencia instantáneamente sin pérdida de energía. A las uniones-energéticas, se les dará una dirección asignándoles una flecha (\longrightarrow). Es decir, como las uniones energéticas establecen la conexión entre los componentes del sistema, cada una de ellas constituye la representación gráfica de una 1-entrada (de una interacción). Ahora bien, en la teoría de circuitos eléctricos hay básicamente dos formas de realizar el arreglo ó unión de los distintos elementos, a saber: en serie y en paralelo. En una unión ideal en serie hay un mismo flujo (corriente) pero distintos potenciales a lo largo de esta; en tanto que en una unión ideal en paralelo, los distintos elementos ven un mismo potencial, dándose distintos flujos entre los elementos que la forman:



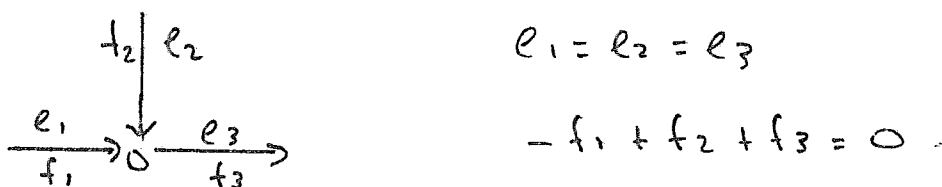
En la termodinámica de circuitos, estos arreglos están representados por dos tipos de uniones ideales, a saber: Uniones-cero (unión-0) y uniones-uno (unión-1), estas uniones son ideales en el sentido de que la potencia que entra a ellas es la misma que sale, es decir:

Una unión-0, representa un arreglo en paralelo, es decir en la expresión para la potencia:

$$P = \sum e_i f_i = 0, \quad \text{se tiene que: } e_i = e_j \quad \forall i, j$$

$$\sum f_i = 0$$

la condición $\sum f_i = 0$, corresponde a la 1ª ley de Kirchhoff de los circuitos eléctricos. Por ejemplo, si en una unión-0 confluyen tres uniones energéticas, se tiene:

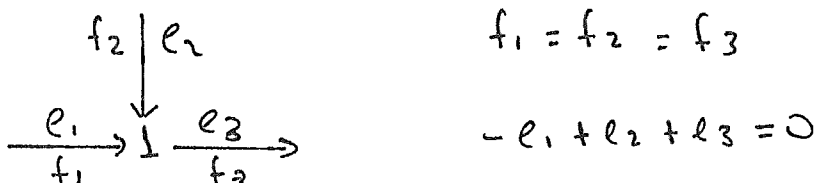


Las uniones-1, representan un arreglo en serie, es decir en la expresión para la potencia:

$$P = \sum e_i f_i = 0, \quad \text{se tiene que: } f_i = f_j \quad \forall i, j$$

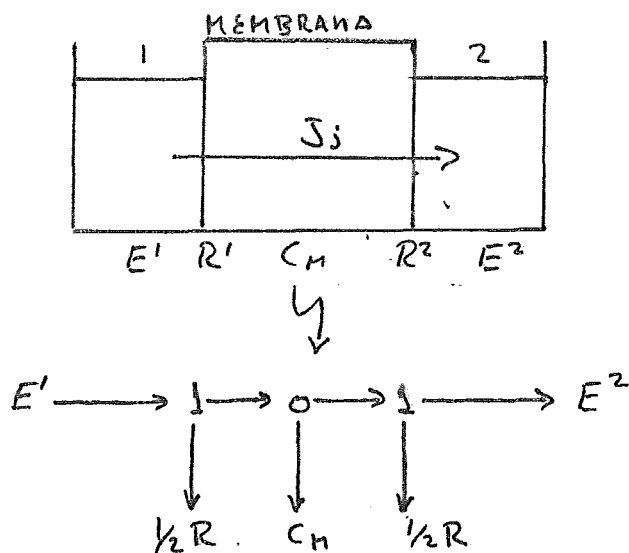
La condición $\sum e_i = 0$, corresponde a la 2ª ley de Kirchhoff de los circuitos eléctricos.

Por ejemplo, si en una unión-1 confluyen tres uniones energéticas, se tiene:



A partir de estas definiciones, podemos observar lo

siguiente en cuanto al modo de usarse: en las uniones-0, de las uniones que confluyen, sale un mismo potencial, pero distintos flujos, esto es, pueden representar una acumulación local de la especie que fluye; por lo tanto las uniones-0 se usan principalmente para conectar condensadores. En las uniones-1, de las uniones que confluyen, sale un mismo flujo, pero distintos potenciales; esto es, pueden representar disipación; por lo tanto las uniones-1 se usan principalmente para conectar resistencias. De esta manera, la representación gráfica del flujo por difusión simple de la especie "j", queda finalmente como:



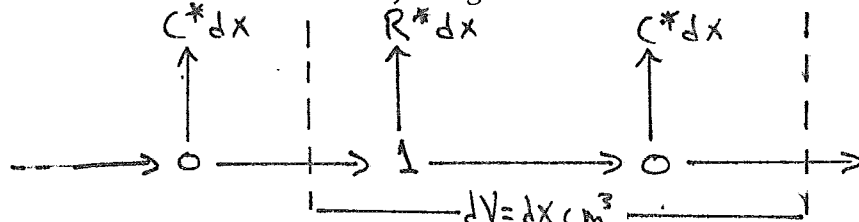
Donde se ha hecho la suposición de que $R_1 = R_2 = \frac{1}{2}R$. En la región cercana al equilibrio, las ecuaciones resistiva y capacitiva son lineales y se pueden escribir en forma matricial. Así, para un elemento resistivo R , se tiene que:

$$\begin{pmatrix} e_1 \\ f_1 \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} 1 & 0 \\ C \frac{d}{dt} & 1 \end{pmatrix} \begin{pmatrix} e_3 \\ f_3 \end{pmatrix} \quad \text{ó} \quad \begin{pmatrix} e_1 \\ f_1 \end{pmatrix} = \underline{\underline{T}}_C \begin{pmatrix} e_3 \\ f_3 \end{pmatrix}$$

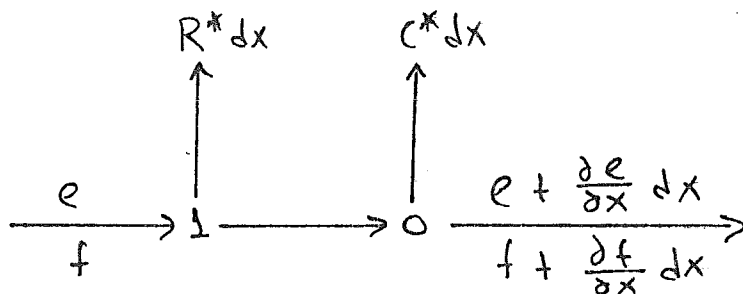
$$\text{Donde: } \underline{\underline{T}}_C = \begin{pmatrix} 1 & 0 \\ C \frac{d}{dt} & 1 \end{pmatrix}$$

A las matrices $\underline{\underline{T}}_R$ y $\underline{\underline{T}}_C$, se les conoce como matrices de transmitancia.

Con el objeto de obtener las ecuaciones dinámicas del sistema en el caso continuo, es necesario descomponer conceptualmente a la membrana en elementos de volúmen infinitesimal $dV \text{ cm}^3$, según se muestra:



Donde R^* , C^* son la resistencia y la capacidad específicas de la membrana respectivamente. Para cada elemento de volumen, los flujos y los esfuerzos que entran estarán relacionados con los que salen mediante la composición de las funciones lineales de los elementos del volumen, es decir, mediante la multiplicación de las matrices de transmitancia correspondientes. Así, para cada elemento de longitud dx tenemos:



$$\text{Es decir: } \begin{pmatrix} e \\ f \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} 1 & R^* dx \\ 0 & 1 \end{pmatrix} \begin{pmatrix} 1 & 0 \\ C^* dx \frac{\partial}{\partial t} & 1 \end{pmatrix} \begin{pmatrix} e + \frac{\partial e}{\partial x} dx \\ f + \frac{\partial f}{\partial x} dx \end{pmatrix}$$

De donde, despreciando los términos de orden-2 en dx , se obtiene:

$$\frac{\partial \rho}{\partial x} + R^* f = 0 \dots (1)$$

$$C^* \frac{\partial \rho}{\partial t} + \frac{\partial f}{\partial x} = 0 \dots (2)$$

Para el caso del flujo de una sustancia "j" eléctricamente neutra, tenemos:

$$\rho = \rho_m = \left. \begin{array}{l} \text{POTENCIAL QUÍMICO DE } j \\ \text{en la membrana} \end{array} \right\}$$

$$f = J_m = \left. \begin{array}{l} \text{flujo de } j \text{ en la} \\ \text{membrana} \end{array} \right\} = J_j$$

$$C^* = C_m = \left. \begin{array}{l} \text{CAPACIDAD ESPECÍFICA} \\ \text{DE LA MEMBRANA} \end{array} \right\}$$

Así en (2):

$$C_m^* \frac{\partial \rho_m}{\partial t} + \frac{\partial J_m}{\partial x} = 0 \quad \text{y como } C_m = \frac{\partial H_m}{\partial \rho_m}$$

$$\Rightarrow \frac{1}{v} \frac{\partial H_m}{\partial t} = \frac{C_m}{v} \frac{\partial \rho_m}{\partial t} = C_m^* \frac{\partial \rho_m}{\partial t}$$

$$\circ \circ \left| \frac{\partial \rho_j}{\partial t} = - \frac{\partial J_j}{\partial x} \right|$$

Que es la ecuación de continuidad, la cual como es bien conocido, debe cumplir todo soluto que atraviese la membrana sin participar en ninguna reacción química (4).

El ejemplo anterior sirve para mostrar la utilidad de esta técnica. Finalmente, introduciremos un elemento de 2-entradas, que permita transformar una forma de energía en otra, esto es, un transductor ideal en el que no ocurra pérdida de energía ($\sum e_i f_i = 0$), y al cual representaremos

$$\text{como: } \frac{e_1}{f_1} \xrightarrow{\text{TD} \begin{matrix} (r) \\ \end{matrix}} \frac{e_2}{f_2}$$

la relación constitutiva (la definición) de este elemento de 2-entradas, tiene la forma general:

$$\begin{pmatrix} e_1 \\ f_1 \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} t_{11} & t_{12} \\ t_{21} & t_{22} \end{pmatrix} \begin{pmatrix} e_2 \\ f_2 \end{pmatrix}$$

la cual con el objeto de que el transductor sea ideal debe cumplir la condición: $e_1 f_1 = e_2 f_2$, esto conduce a que: $t_{21} = t_{12} = 0$ y $(1/t_{11}) = t_{22} \equiv r$

$$\Rightarrow \begin{pmatrix} e_1 \\ f_1 \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} 1/r & 0 \\ 0 & r \end{pmatrix} \begin{pmatrix} e_2 \\ f_2 \end{pmatrix} \Leftrightarrow \begin{cases} e_1 = (1/r) e_2 \\ f_1 = r f_2 \end{cases}$$

A "r" se le denomina relación de transferencia ó módulo del transductor.

Así, en una reacción química cada uno de los reactivos y productos se representa mediante un condensador a potencial μ_i , el cual se descarga si "i" es un reactivo ó se carga si es un producto. Ahora bien, la especie química que se encuentra en la mezcla de reacción (condensador) con un potencial μ_i , participa en la reacción-k, con el potencial μ_i ponderado por el coeficiente estequiométrico de "i" en la reacción-k (ν_{ik}); por lo tanto el condensador de "i" debe conectarse a un transductor de módulo $r = \nu_{ik}$.

Toda reacción química constituye un proceso irreversible disipativo, por lo que su representación además de los elementos mencionados arriba, debe incluir una resistencia (R_r) introducida a través de uniones-1. Si la reacción se encuentra cerca del equilibrio R_r es una 1-entrada ($\rightarrow R_r$)

cuya relación constitutiva de acuerdo con la termodinámica irreversible es:

$$J_R = \frac{1}{R_R} A$$

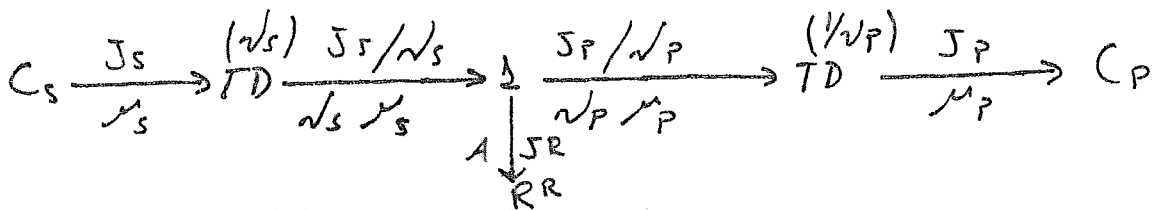
donde:

$$J_R = \left\{ \begin{array}{l} \text{flujo reactivo } \sigma \\ \text{velocidad de reacción} \end{array} \right\}$$

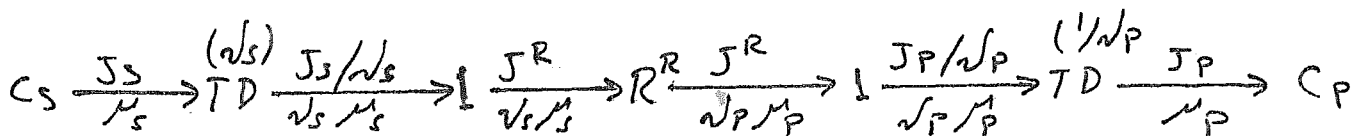
$$A = \left\{ \text{Afinidad de la reacción} \right\}$$

Así por ejemplo, la reacción: $\nu_S S \longrightarrow \nu_P P$

cerca del equilibrio puede representarse como:



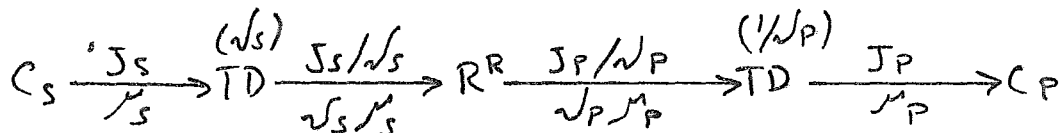
Katchalsky (4) demostró que si una reacción se encuentra lejos del equilibrio, R_R debe ser una 2-entrada ($\rightarrow R^R \rightarrow$); por lo tanto la gráfica anterior se modificaría en:



la cual tomando en cuenta que:

$$J^R = J_S / \nu_S = J_P / \nu_P$$

se simplifica a:



Lo anterior, constituye solamente un resumen del manejo operacional de la termodinámica de circuitos según lo presentó Katchalsky (4, 5), en este resumen no se ha prestado mucha atención al aspecto formal de la misma. El objetivo que se ha perseguido con ello, es mostrar el empleo de las gráficas de unión para representar procesos de interés biológico, como son, las reacciones químicas y la

difusión a través de membranas. En este trabajo se realizó un estudio experimental del transporte de aminoácidos en la levadura del pan Saccharomyces cerevisiae, en el que dos aspectos del mismo se representan mediante la termodinámica de circuitos.

III. El TRANSPORTE EN LAS LEVADURAS DEL GENERO Saccharomyces:

A) Importancia.

La levadura es un organismo unicelular eucarionte con pared celular, estas características la convierten en un objeto de estudio a la vez interesante y conveniente; ésto se debe a que:

- 1) Son organismos cuya obtención comercial y mantenimiento en el laboratorio son sumamente económicos.
- 2) Son económicamente importantes por su utilización en la elaboración de pan, vino y cerveza.
- 3) Presentan un tiempo generacional corto, lo que en principio hace posible la obtención de mutantes que no se pueden obtener en muchos otros eucariontes multicelulares con tiempos generacionales largos.
- 4) Presentan una pared celular rígida, lo que las hace sujetos experimentales ventajosos, pues permite manipularlas fácilmente sin temor a que las células se rompan por ejemplo, al haber cambios en la osmolaridad del medio.

Por otro lado, son organismos en sí mismos interesantes, entre otras cosas, por lo siguiente:

- 1) Al ser unicelulares, en la naturaleza se encuentran expuestos a medios cambiantes, razón por la cual es de esperarse (y de hecho así sucede) que presenten una flexibilidad adaptativa grande. Esto contrasta con lo que sucede en otros eucariontes multicelulares, en los que las

células están adaptadas a un ambiente que es básicamente constante.

2) Son organismos que se conocen con gran detalle; en ellos se describieron muchas vías metabólicas.

3) Siendo eucariontes, en su membrana plasmática tienen una bomba de H^+ , en tanto que la mayoría de los eucariontes pluricelulares tienen bombas de $Na^+ - K^+$ (6,7,8).

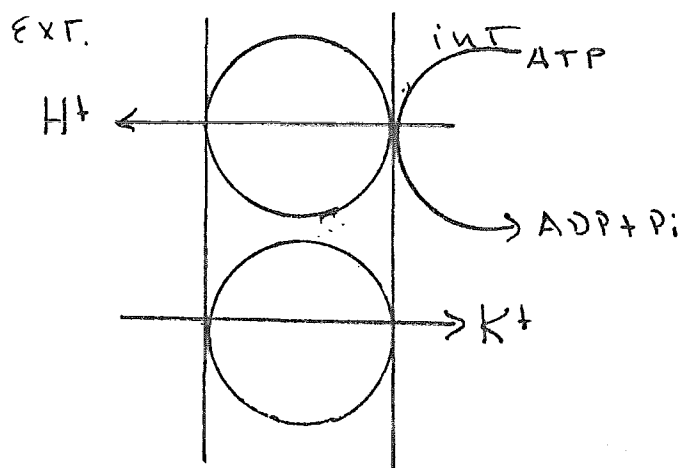
Este último aspecto señala la importancia que desde el punto de vista biológico tienen los estudios de transporte en las levaduras, pues en principio hace pensar que estos organismos tienen una ubicación filogenética muy peculiar en cuanto a la evolución de los sistemas de transporte.

B) TRANSPORTE DE IONES. FLUJOS DE H^+ Y K^+ .

La existencia de una bomba electrogénica de H^+ en la membrana plasmática de la levadura, fue postulada por primera vez por Peña estudiando el efecto del K^+ sobre los intermediarios de la glucólisis. Se había reportado que el K^+ aumentaba la velocidad de fermentación y respiración en la levadura, y que su entrada a las células se llevaba a cabo en un intercambio por H^+ utilizando la energía redox derivada del metabolismo; los experimentos realizados por Peña mostraron que la adición de K^+ a pH bajo (pH 4.0), causaba un aumento en los niveles de NADH y una disminución inmediata de los niveles de ATP, así como un aumento en los de ADP y Pi (9, 10). El aumento en los niveles de NADH

contradecía la hipótesis de que la entrada de K^+ utilizara energía redox, pues en ese caso se habría observado una disminución en los niveles de NADH; por otro lado, la disminución de los niveles de ATP explicaba el aumento en la velocidad de respiración y fermentación producidos por el K^+ .

Peña además encontró que se podían obtener los mismos resultados aumentando el pH del medio sin necesidad de agregar K^+ , y más aún, que cuando el pH era alto el K^+ ya no producía ningún efecto. Todo esto lo explicó postulando la existencia de una bomba de H^+ en la membrana plasmática de las levaduras cuya fuente de energía sería directamente el ATP (y no la derivada de la transferencia de electrones entre pares redox), la cual a valores bajos del pH del medio expulsaría H^+ solo en presencia de K^+ para intercambiar por el H^+ , en tanto que a pH alto sacaría H^+ aún en ausencia de K^+ (en este caso la salida de H^+ iría probablemente acompañada por la salida de aniones). Por otro lado, el hecho de que la bomba sacara H^+ a pH alto sin que se necesitara K^+ , indicaba que la salida de H^+ y la entrada de K^+ deberían de llevarse a cabo a través de sistemas de transporte distintos. En conclusión, se propuso el siguiente modelo para los flujos de H^+ y K^+ en las levaduras (10) :



Posteriormente, mediante el empleo de colorantes catiónicos, Peña encontró que es posible bloquear el transporte de K^+ sin afectar el bombeo de H^+ (11, 12, 13), demostrando así que efectivamente ambos flujos se dan por acarreadores diferentes, y que además es probable que el transportador de K^+ sea común a todos los cationes monovalentes.

Actualmente, la existencia de la bomba de H^+ está plenamente demostrada; la enzima pura ha sido aislada (14), y todo parece indicar que tanto el transportador de cationes monovalentes como la bomba de H^+ son constitutivos (15), a diferencia de los acarreadores de aminoácidos, fosfato y sulfato que son inducibles.

Experimentos realizados por el grupo de Kotyk, indican que la salida de H^+ muestra saturación respecto a la concentración de glucosa y a la densidad de levaduras, lo que de acuerdo con estos autores señala que las levaduras tienden a formar un ΔpH constante (16); además reportaron que el grado de acidificación del medio que producen se encuentra sujeto al control del pH externo. Cabe señalar que los experimentos realizados por Peña demuestran que ese control se pierde cuando hay K^+ a pH bajo. En concordancia con esto último, se ha propuesto (17) que la interrelación de los flujos de H^+ y K^+ permite a las levaduras crear un gran ΔpH sin variar mucho el $\Delta \psi$ y han dicho que para explicar los flujos observados, se requiere de al menos una ATP-asa de H^+ (ya demostrada), un canal electrogénico de K^+ y un antiportador H^+/K^+ .

Fuera de lo anterior, no es exagerado decir que pese a los esfuerzos realizados se ha avanzado poco en la comprensión del transporte de cationes en las levaduras, y aún subsisten muchas dudas a cerca de la manera en que ocurren los flujos de iones.

C) TRANSPORTE DE AMINOACIDOS

1.- CARACTERISTICAS CINETICAS. EL PAPEL DEL NH_4^+ .

Actualmente se considera un hecho que la entrada de aminoácidos a las levaduras se da a través de dos tipos de sistemas de transporte a saber (6) : sistemas específicos y una permeasa general (PG) poco específica. El origen de este esquema data de la década de los sesentas, cuando el grupo de Grenson reportó que en células crecidas en un medio con NH_4^+ como fuente de nitrógeno, se observa lo siguiente en relación al transporte de arginina, lisina y metionina:

- 1) El transporte de arginina (Tabla 1) se da a través de una sola permeasa (18).
- 2) La entrada de lisina ocurre a través de dos sistemas de transporte, uno de los cuales es el de arginina (19).
- 3) Ninguna de las dos permeasas de lisina es inhibida por citrulina.
- 4) El transporte de Metionina, tiene lugar por medio de dos acarreadores uno específico de alta afinidad y otro de baja afinidad que parece compartir con serina o treonina (20).

En esos mismos trabajos, se demostró que las permeasas son genéticamente independientes; pues se obtuvieron mutantes (aminoácido-p1) que carecían específicamente de alguno de estos sistemas. Así por ejemplo, el mutante Arg-p1 no transporta Arg (18); sin embargo, si las levaduras se crecían en un medio con prolina en vez de amonio como fuente de nitrógeno, esos mismos mutantes Arg-p1 podían transportar Arginina obteniéndose resultados análogos con los otros dos aminoácidos (19, 20). En línea con este último resultado, 4 años después, en 1970, el grupo de Grenson reportó que (21) :

- 1) La velocidad de entrada de varios aminoácidos aumenta cuando las células crecen en un medio con prolina en vez de NH_4^+ .
- 2) El doble mutante (Arg-p1, Lys-p1) crecido en un medio con prolina, es capaz de transportar arginina, lisina, trptofano y citrulina; y estos aminoácidos al entrar se inhiben mutuamente en forma competitiva.
- 3) La mayoría de las permeasas específicas no son afectadas por el NH_4^+ .

Estos resultados llevaron a Grenson a la conclusión de que además de las permeasas específicas, las levaduras presentan una permeasa general de aminoácidos (PG), inhibible por el NH_4^+ , capaz de mediar la entrada de todos los aminoácidos con excepción de los ácidos y de la prolina. (Tabla 2); en relación con esto, en el mismo trabajo Grenson reportó que :

- 1) Se aisló un mutante (gap) que no presenta la PG

- 2) La citrulina entra solo por la PG
- 3) La leucina inhibió en 91% la entrada de citrulina, por lo que es capaz de inhibir la PG
- 4) La prolina tiene un sistema independiente de transporte también inhibible por NH_4^+ , cuyos parámetros cinéticos son :
 $K_m = 0.030 \text{ mM}$, $V_{\text{max}} = 16 \text{ nmoles}/(\text{min.mg prot})$.

Tabla 1. Parámetros cinéticos reportados por Grenson para el transporte de aminoácidos en levaduras crecidas en un medio con amonio como fuente de nitrógeno.

Aminoácido	# permeasas	K_{m1} (mM)	K_{m2} (mM)
Arg	1	0.01	-----
Lys	2	0.017	0.200
Met	2	0.012	0.770

Tabla 2. Parámetros cinéticos reportados por Grenson para el transporte de aminoácidos a través de la PG en levaduras crecidas en un medio con Pro como fuente de nitrógeno.

Aminoácido	K_m (mM)
Cit	0.080
Arg	0.0076
Lys	0.0031
Tph	0.010

Además del modelo cinético propuesto, en estos trabajos se hizo evidente que el NH_4^+ puede interferir con el transporte de aminoácidos la levadura. Esta interacción en principio

puede entenderse si se toma en cuenta que tanto el amonio como los aminoácidos constituyen una fuente de nitrógeno importante para las levaduras (22). Un hecho que señala la importancia de este catión para el metabolismo de estas células, es que es probable que presenten tres sistemas de transporte para él (23); datos obtenidos en el laboratorio de Peña, indican que la entrada de NH_4^+ es un proceso que requiere de energía y que la especie química que cruza la membrana al entrar a las células es el catión NH_4^+ en vez de la especie eléctricamente neutra NH_3 (24); este dato es interesante en sí mismo, dado que comúnmente los ácidos cruzan las membranas biológicas en su forma química eléctricamente neutra.

Por lo que toca al efecto inhibitorio del amonio sobre el transporte de aminoácidos, se ha demostrado que presenta las siguientes características (25) :

- 1) La inhibición es reversible; esto es, una vez que las levaduras son puestas en un medio sin amonio, la capacidad de transporte se recupera, con un curso temporal que parece depender del tiempo que pasaron previamente en presencia del catión.
- 2) La inhibición por NH_4^+ , ocurre a través de dos mecanismos independientes, por inactivación de las permeasas presentes en la membrana y por represión de la síntesis de nuevas permeasas.

Es importante señalar que estos resultados fueron obtenidos midiendo el transporte de citrulina, la cual como se indicó

anteriormente se supone que entra a las levaduras sólo a través de la PG.

En cuanto a la inactivación de la PG, experimentos realizados con mutantes permitieron proponer el siguiente modelo :

El locus génico GAP1 de las levaduras, es un gene estructural que codifica un constituyente específico de la PG. En uno de los extremos de GAP1, se encuentra el locus génico PGR, el cual se ha reportado (26) que determina un sitio receptor sobre el que actúa continuamente un control negativo (inhibitorio) ejercido por los productos de dos genes no ligados MUT2 y MUT4. Existe además otro gene, el gene NPR1 que codifica una proteína que se cree responsable de proteger al GAP1 y por lo tanto a la PG contra el efecto inactivatorio de los productos de los genes MUT2 y MUT4. Grenson (26) ha propuesto que la entrada de NH_4^+ a las células incapacita al mecanismo reactivatorio de NPR1 para compensar la inactivación ejercida por MUT2 y MUT4, probablemente porque el NH_4^+ o un derivado de éste reprime a la proteína codificada por NPR1, o bien activa al sistema MUT2, MUT4.

Otros sistemas de transporte que han sido señalados como sensibles al NH_4^+ por el grupo de Grenson, son : el del glutamato, ureidosuccinato y dos permeasas de metilamina/amonio (25), recientemente Horák y Rihová han reportado que el transporte de prolina en S. cerevisiae se da a través de dos sistemas, uno de los cuales tiene los parámetros cinéticos y la sensibilidad al NH_4^+ descritos

previamente por Grenson (27). En *S. ellipsoideus*, se ha reportado que el NH_4^+ inhibe el transporte de leucina (28); por otro lado, recientemente se ha reportado que en bacterias fijadoras de nitrógeno, el NH_4^+ disminuye la velocidad de entrada de todos los tipos de aminoácidos (29). A manera de resumen, estos datos parecen indicar que el NH_4^+ inhibe a una gran cantidad de permeasas de aminoácidos tanto en levaduras como en otros microorganismos.

2) PAPEL DE LOS CATIONES MONOVALENTES EN EL TRANSPORTE DE AMINOACIDOS. RELACION CON LOS REQUERIMIENTOS DE ENERGIA.

A partir de los trabajos de Mitchell, es bien conocido que, la energía contenida en el gradiente electroquímico de los iones a través de la membrana puede utilizarse en la captura activa de nutrientes. En el caso del transporte de aminoácidos en levaduras del género *Saccharomyces*, el grupo de Eddy reportó que en células en las que el metabolismo se encontraba limitado por inhibidores de la glucólisis y la respiración, se observaba que :

- 1) La entrada de leucina, lisina, fenilalanina, glicina y aminoisobutarato es mayor a pH 4.5 que a pH 7.4 (29).
- 2) La captura de glicina, citrulina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina y prolina se acompaña por la entrada de 1 a 2 equivalentes de H^+ (31, 32, 33).
- 3) La entrada de glutamato se acompaña por un flujo de hasta 3 equivalentes de H^+ (lo mismo se observó para el

transporte de fosfato) (34).

4) El mayor flujo de H^+ parece ocurrir a través de la PG (31).

De estos resultados Eddy pensó que la entrada de aminoácidos a las levaduras ocurre mediante cotransporte con H^+ ; es decir, que el $\Delta\bar{\mu}_H$ existente a través de la membrana plasmática, proporciona la energía necesaria para la acumulación de estas moléculas mediante el acople del influjo del H^+ al del aminoácido. En cuanto al papel del K^+ en este proceso, Eddy reportó que :

1) La entrada de leucina, lisina, fenilalanina, glicina y aminoisobutarato disminuye con la presencia de K^+ en el medio de incubación (30, 33).

2) Junto con la entrada de H^+ que acompaña la captura de aminoácidos, es posible observar un eflujo equivalente de K^+ (32, 33, 34).

De esta manera, Eddy llegó a la conclusión de que la entrada de aminoácidos en levaduras carentes de energía metabólica se da por cotransporte con H^+ , siendo balanceada la entrada de carga eléctrica mediante un eflujo equivalente de K^+ , por lo cual este catión agregado al medio de incubación produce inhibición de la entrada de los aminoácidos. Es importante recalcar que estos resultados se obtuvieron en levaduras que carecían de energía metabólica y su generalización a células con un metabolismo normal no es directa; el mismo Eddy observó que al menos por lo que toca al transporte de glicina, la dependencia de éste respecto al pH y el efecto inhibitorio del K^+ no eran tan claros cuando

las levaduras disponian de energía (35); no obstante tambien es necesario señalar que recientemente el grupo de Slayman ha realizado experimentos que apoyan a la conclusión de Eddy en cuanto al papel del H^+ en el transporte de glicina (36); dentro de esta misma tendencia Ohsumi y Anraku han reportado que en la membrana de la vacuola de la levadura existe una Mg-ATPasa sensible a DCCD, la cual crea un $\Delta\psi$ cuya energía se emplea en parte para acumular (mediante cotransporte con H^+) aminoácidos básicos en la vacuola (37).

Los trabajos de Anraku y de Slayman coinciden con la hipótesis de Eddy, pero aún es necesario aclarar algunos aspectos; dado que tambien existen resultados que no encajan dentro de dicho esquema. Así, el grupo de Kotyk reportó que ni el Na^+ ni el K^+ juegan papel alguno en el transporte de aminoácidos (38); por otro lado, nosotros estudiando el transporte de leucina en *S. cerevisiae* encontramos que cuando las células no han sido preincubadas y no disponen de energía metabólica desde antes de la adición de los inhibidores de la respiración y la glucólisis, la entrada de leucina no es mayor a pH bajo que a pH alto (39). Por otra parte hemos visto que el K^+ desempeña un papel complejo en el transporte de aminoácidos, que no puede explicarse únicamente en términos de neutralizar la carga eléctrica neta que cruza la membrana. Finalmente, es conveniente hacer notar en este momento que el empleo de vesículas de membranas de levaduras probablemente resulte una herramienta poderosa para afirmar o descartar la hipótesis de Eddy, esto

aparejado a que se obtenga una visión más clara acerca de los sistemas de transporte de iones en las levaduras.

3) SINTESIS DE PROTEINAS RELACIONADAS CON PROCESOS DE TRANSPORTE. PAPEL DE LOS CATIONES MONOVALENTES.

El proceso a que se somete a las levaduras antes de la realización de estudios de transporte presenta variantes de un laboratorio a otro. Sin embargo, en términos generales consiste en dos fases : primero las células son puestas a crecer durante varias horas en un medio rico en nutrientes y al finalizar este período son lavadas por centrifugación, se ponen en agua desionizada y se dejan por varias horas burbujeándoles aire; esta segunda fase tiene por objeto que las levaduras consuman las reservas energéticas que acumularon al estar en el medio rico en nutrientes, de tal forma que al iniciar el estudio de transporte podamos tener la seguridad de que el sustrato que consuman sea precisamente el que en ese momento se les dé. Es bien conocido que durante la fase de aereación en agua, las levaduras degradan varios de sus sistemas de transporte (15, 40); de hecho es probable que los únicos sistemas constitutivos que no son degradados en ese tiempo son la ATP-asa de H^+ (15) y el transportador de K^+ (Peña, observaciones no publicadas); así, cuando las células son puestas en presencia de un sustrato fermentable (glucosa) o respiratorio (etanol), éste, al mismo tiempo que

constituye una fuente de energía, da lugar a una señal que desencadena la síntesis de los sistemas de transporte que habían sido degradados; en relación con esto, el grupo de Kotyk ha reportado que :

1) La actividad de transporte de glicina, leucina, prolina, aminoisobutarato, fosfato y sulfato aumenta al preincubar las células con glucosa con un período de latencia y una velocidad distinta para cada compuesto (15, 40, 41, 42).

2) El aumento en la actividad de transporte, en todos los casos esta asociado a un aumento paralelo en la síntesis general de proteínas, y es por consiguiente suprimido al agregar un inhibidor de ésta, la cicloheximida (CH).

3) Con excepción del fosfato (15) la K_m para los demás compuestos permaneció constante, aumentando solamente la V_{max} .

4) Estimaciones del $\Delta \bar{J}_{H^+}$ durante la preincubación con glucosa muestran que este se establece casi de inmediato y después presenta muy poca variación conforme transcurre el tiempo (15), de modo que :

5) El aumento en la actividad de transporte no puede deberse a cambios en el $\Delta \bar{J}_{H^+}$ sino más bien a un aumento en la cantidad de acarreadores en la membrana (15).

Así mismo, se ha estudiado el papel que el NH_4^+ y el K^+ desempeñan dentro de la estimulación del transporte por glucosa. En concordancia con el efecto inhibitorio del NH_4^+ que se ha reportado en el transporte de aminoácidos, Kotyk encontró que este ion inhibió parcialmente la entrada de

leucina (15) y de sulfato (40), en tanto que no tuvo ningún efecto sobre la captura de fosfato (42); sin embargo resultados obtenidos en nuestro laboratorio, muestran que en nuestras condiciones de trabajo el NH_4^+ estimula el transporte de fosfato (43) y que a diferencia de lo reportado por Kotyk, la K_m para el fosfato se mantiene constante al preincubar con glucosa. Estas diferencias pueden deberse a :

- 1) La cepa de S.cerevisiae que utiliza Kotyk no es isogénica a la empleada por nosotros y/o
- 2) Las diferencias antes aludidas en el proceso a que se someten las levaduras antes de los experimentos.

En relación al papel del K^+ , Kotyk reportó que este cation agregado al medio de incubación aumenta la estimulación por glucosa del transporte de sulfato (40); sin detenerse a estudiar este proceso; el mismo resultado obtuvimos nosotros con el transporte de leucina (39).

A manera de resumen podemos decir que la glucosa desempeña dos funciones paralelas : a) Constituye una fuente de energía inmediata para las células, lo que le permite activar de inmediato sus sistemas de transporte constitutivos, creando así gradientes electroquímicos de iones (H^+ , K^+) y b) Constituye directa ó indirectamente una señal que inicia la síntesis de una gran variedad de sistemas de transporte.

En cuanto al papel que los cationes monovalentes desempeñan dentro de este proceso, podemos resumirlo como sigue:

- 1) Los gradientes electroquímicos de los iones pueden

emplearse como fuente directa de energía para la captura de nutrientes; a este respecto Eddy ha propuesto que el $\Delta\bar{K}^+$ es la fuente directa de energía para el transporte de aminoácidos, fosfato y algunos carbohidratos, con el K^+ manteniendo un balance neutro de carga eléctrica, en tanto que Kotyk propone que ni el K^+ ni el Na^+ juegan papel alguno en la entrada de aminoácidos.

2) Los cationes monovalentes (NH_4^+ , K^+) durante el tiempo de preincubación con glucosa, directa o indirectamente dan lugar a una señal que elimina o potencia el efecto de la glucosa.

4) EL TRANSPORTE DE L-LEUCINA EN LEVADURAS DEL GENERO Saccharomyces.

El transporte de L-Leu ha sido estudiado ampliamente por el grupo de Ramos y Stoppani quienes han reportado que en S.cerevisiae presenta las siguientes características (44, 45, 46) :

- 1) El transporte parece ser activo, como lo demuestra su abatimiento por inhibidores del metabolismo.
- 2) La entrada de leucina al tiempo cero (veu) representa un 40% de la entrada total en células sin energía, pero su contribución es pequeña en células que disponen de energía.
- 3) La veu depende del metabolismo.
- 4) Concentraciones de glucosa por encima de 5mM parecen

tener un efecto inhibitorio en el transporte.

5) La entrada de leucina se da a través de dos sistemas cuyos parámetros cinéticos dependen del estado metabólico de las células.

6) Estos sistemas de transporte caen dentro de la categoría de los firmemente unidos a la membrana (8) ya que el valor de sus parámetros cinéticos es el mismo en células enteras que en protoplastos, los cuales de acuerdo con Kotlyar y Ramos (46) son :

	Km ₁ (mM)	Vmax ₁	Km ₂ (nmoles/min.g)	Vmax ₂
células enteras	0.034		530	0.41 1590
prtoplastos	0.084		1060	0.93 3770

7) Los acarreadores de leucina no presentan grupos -SH expuestos a la superficie externa de la membrana (47).

Este grupo estudió también el transporte de leucina en *S.ellipsoideus* y reportó que (28) :

1) Sus características cinéticas son similares a las que presenta *S.cerevisiae*.

2) Los parámetros cinéticos de los acarreadores varían con el estado metabólico de las levaduras, y son :

	Km ₁ (mM)	Vmax ₁ (nmoles/min.g)	Km ₂	Vmax ₂
sin energía	0.05	111	2.9	311
con energía	0.14	3200	0.49	6100

3) La preincubación con NH₄⁺ durante 25 min, estimuló la captación a los 10 segs, pero la inhibió a los 5min.

En relación con estos trabajos podemos hacer las siguientes

observaciones : Priméro, si el transporte es activo, como se explica este en células sin energía ?. Segundo, la v_{eu} es un valor extrapolado a tiempo cero y parece poco probable que represente el 40% de la captación total. Tercero, en ese mismo trabajo (44) se reportaron valores negativos de K_m y V_{max} , lo que se adjudicó a la v_{eu} . Cuarto, un efecto inhibitorio por glucosa es difícil de visualizar. Quinto, el efecto reportado para el amonio es poco claro y no es posible concluir nada en concreto a partir de él. Todas estas observaciones así como los resultados contradictorios entre el grupo de Eddy y el de Kotyk, nos motivaron a estudiar el transporte de Leu en células de S.cerevisiae que han alcanzado el estado estacionario de crecimiento (39), nosotros encontramos que en relación con los requerimientos de energía :

- 1) El transporte de Leu es activo y por consiguiente en células sin energía es pequeño a cualquier pH y a diferencia de lo reportado por Eddy en estas condiciones no se observó que hubiera una mayor entrada a pH bajo (pH 4.0) que a pH alto (pH 8.5).
- 2) En concordancia con lo reportado por Kotyk (15), para obtener captaciones significativas de leucina, no basta con que exista glucosa en el medio, sino que además se requiere preincubar a las levaduras con la glucosa durante tiempos largos (60 min).
- 3) A diferencia de lo reportado por Stoppani, encontramos que a medida que aumenta la concentración de glucosa, la

entrada de leucina aumenta, hasta que la concentración de glucosa es de 150 mM a partir de la cual, la captación de leucina tiende a hacerse constante.

4) Al igual que la glucosa, el etanol con agua oxigenada es un buen sustrato y en ambos casos el inhibidor metabólico que resultó más efectivo para bloquear el transporte de leucina, fue la azida de sodio un inhibidor de la respiración, lo que demuestra que aún con glucosa como sustrato, se requiere de la participación de la mitocondria en el proceso de transporte.

5) En células que han sido preincubadas con glucosa el pH 6.0 resultó el óptimo para la captación de Leu.

Por lo que toca a los aspectos cinéticos, observamos que :

1) A diferencia de lo reportado en la literatura en nuestras condiciones de trabajo el transporte de leucina se da a través de un solo sistema cuyos parámetros cinéticos son $K_m = 0.215 \text{ mM}$ y $V_{max} = 1144 \text{ nmolas}/(\text{min.g})$. Cabe hacer notar que estos valores son del mismo orden de magnitud que los del sistema 2 reportado por Kotlyar y Ramos, por lo que es probable que se trate del mismo sistema.

2) El acarreador de leucina es altamente específico para este aminoácido, ya que el glutamato no inhibió el transporte en tanto que la lisina y la alanina lo inhibieron pero ninguno en forma competitiva.

En cuanto al papel del Na^+ y del K^+ encontramos que :

1) En concordancia con lo reportado por Kotyk, el Na^+ agregado junto con la leucina tuvo un efecto ligeramente inhibitorio sólo a concentraciones por arriba de 10 mM, en

tanto que a concentraciones menores no tuvo ningún efecto.

El K^+ presentó un ligero efecto inhibitorio a todas las concentraciones y este no fue de tipo competitivo.

2) A diferencia del efecto mencionado arriba, cuando las células se preincubaban con K^+ durante una hora hay un incremento notable en la captación de leucina a cualquier pH. Haciendo un paréntesis es importante señalar que en nuestro laboratorio se han encontrado resultados análogos para el transporte de fosfato.

OBJETIVOS

Con base en los resultados que obtuvimos en el transporte de leucina y a los reportes de la literatura, decidimos que era conveniente proseguir el estudio del transporte de aminoácidos con el objeto de :

- 1) Establecer si nuestras levaduras presentan la PG reportada por Grenson, ya que observamos que la entrada de Leu se da a través de un solo sistema que además es muy específico por este aminoácido.
- 2) Determinar la generalidad del efecto estimulatório del K^+ dentro del transporte de aminoácidos y obtener información acerca del mecanismo por el cual se lleva a cabo.

3) Elaborar una gráfica de union para incorporar la información experimental que se obtenga, con el objeto de establecer hipótesis que, en el futuro, lleven al diseño de nuevos experimentos.

MATERIALES Y METODOS.

MATERIALES.-

Se trabajo con la levadura Saccharomyces cerevisiae, obtenida comercialmente de la fábrica " La Azteca".

Todos los reactivos utilizados son de grado analítico. Los aminoácidos no radiactivos fueron obtenidos de Sigma Chemical Company; la L-(3,4,5-³H)-Leucina, la L-(ureido-¹⁴C)-Citrulina y el L-(¹⁴C (U))-Aspartato, se obtuvieron de New England Nuclear.

METODOS.-

-- Tratamiento de la levadura previo a cada experimento (48) : -

Se pesaron 7.5 g de la levadura, y se suspendieron en 250 ml de medio de cultivo de De Kloet (49), añadiendo 0.250 ml del antiespumante FG-10 de Corning. La mezcla se incubó durante 8 horas a 30°C, burbujeando aire a través de un vidrio poroso. Al término de este tiempo, las levaduras se lavaron dos veces por centrifugación durante 10 min a 600 G (2000 rpm); hecho esto, las células se resuspendieron en agua destilada en un volumen total de 300ml y se dejaron aerear durante 16 horas a 30°C; transcurrido este tiempo, las células se lavaron dos veces por centrifugación durante 10 min a 600 G (2000 rpm), después de lo cual se pesó la levadura y se resuspendió en agua desionizada en un volumen total igual al doble del peso humedo de la levadura.

-- Tratamiento de la levadura durante los experimentos.-

A menos que otra cosa se indique, previamente al ensayo de transporte, las células a una densidad de 50 mg/ml fueron preincubadas durante una hora en un buffer MES-TEA 20 mM pH 6.0 con glucosa 150 mM (medio A), más las adiciones que en cada caso se indiquen (39).

-- Medida del transporte de aminoácidos.-

Terminada la preincubación en el medio A, se agregó el aminoácido radiactivo a la mezcla de ensayo, hecho esto a los tiempos que se indican más adelante, se tomaron de cada mezcla de ensayo dos muestras (F, T) de 0.1 ml cada una. La muestra F se lavó por filtración en filtros marca Sartorius de 450 nm con 15 ml de agua desionizada a 0 °C; a los filtros así obtenidos, se les agregó 5 ml del líquido de centelleo Tritosol (49), y se contaron en un contador de centelleo líquido TRI-CARB 300C. A la otra muestra (T), se le agregó directamente 5 ml de Tritosol y se contó, para conocer la radiactividad total agregada a cada mezcla de ensayo.

La captación de aminoácidos por las levaduras se calculó de la siguiente manera :

$$\text{Captación} = (C.F / C.T) * (S * D)$$

donde :

C.F = Cuentas por minuto (cpm) en la muestra F

C.T = cpm en la muestra T.

S = nmolas aminoácido / ml.

D = Factor de dilución (D = 20 en la mayoría de los experimentos).

A menos que otra cosa se indique, la entrada de un aminoácido a las levaduras esta expresada como :

$$V = \text{nmolas aminoácido} / (\text{min} * \text{g}).$$

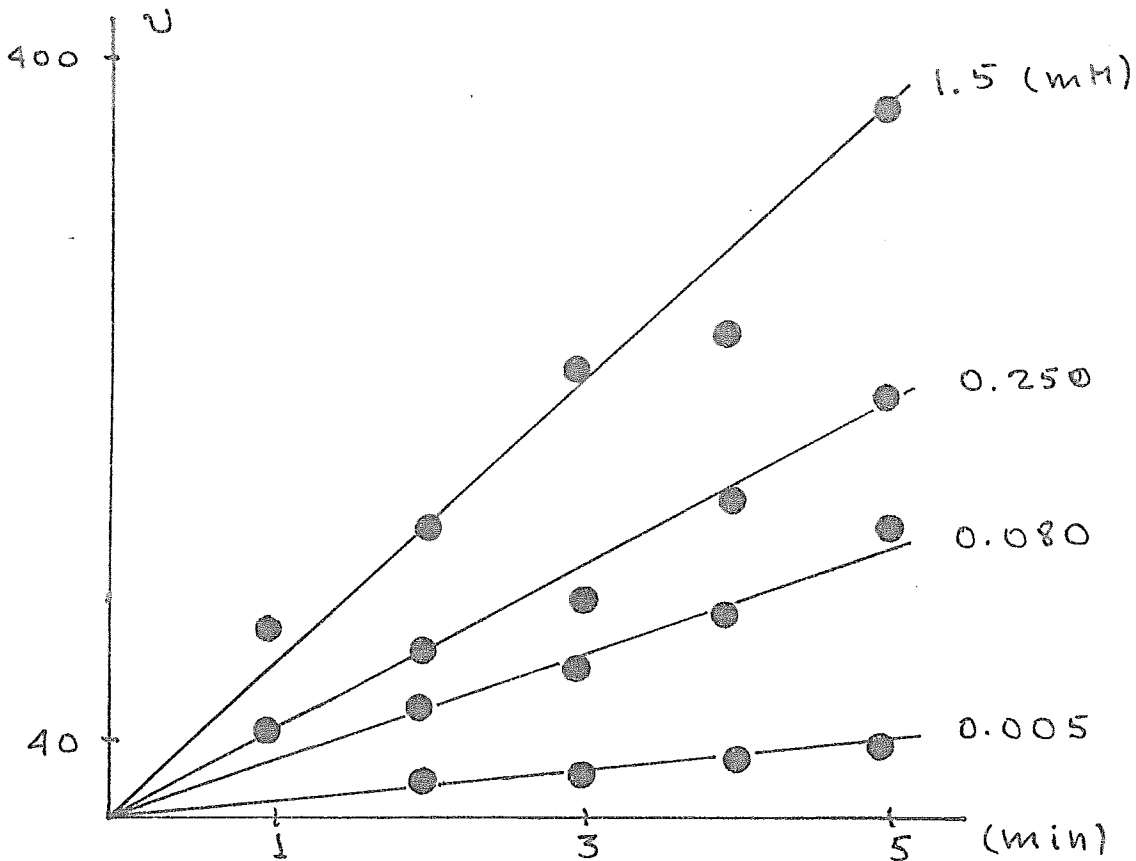
En cada figura, a menos que otra cosa se indique, se presentaran los datos correspondientes a un experimento representativo de un conjunto de por lo menos tres.

En el caso del transporte de leucina, encontramos anteriormente que este se encuentra en velocidades iniciales hasta los 5 min (39). La fig. 1, muestra que también el transporte de citrulina es lineal hasta los 5 min; debido a esto, decidimos incubar a las levaduras durante 3 min con el aminoácido radiactivo en los experimentos sin KCl y 2 min en los experimentos con KCl ya que el K^+ parece sacar al sistema de velocidades iniciales (datos no mostrados). Para el aspartato, no se determinó el intervalo en el cual se encuentra en velocidades iniciales ya que con este aminoácido no se hicieron cinéticas.

-- Medición de síntesis de proteínas.--

La síntesis de proteínas se midió mediante la incorporación a estas de $L\text{-}^3\text{H}\text{-Leucina}$ para lo cual, las células se preincubaron con $L\text{-}^3\text{H}\text{-Leucina}$ 0.200 mM en el medio A más las adiciones que en cada caso se indican, a distintos intervalos de tiempo, se tomaron de las mezclas de ensayo, muestras de 0.1 ml y se mezclaron cada una con 1 ml de TCA al 10 % (w/ v), el precipitado total obtenido con TCA se se lavó por filtración con 15 ml de agua desionizada a 0 °C y

Fig. 1. Velocidades iniciales de la entrada de L-Citrulina. Las células fueron preincubadas durante una hora en el medio A. al cabo de ese tiempo se agregó L- 14 C-citrulina a las concentraciones que se señalan y a los tiempos indicados se tomaron muestras y se determinó la captación.



la radiactividad del material que quedó en los filtros se midió en forma análoga a como se señaló en el transporte de aminoácidos.

Para inhibir la síntesis de proteínas, se agregó 0.4 mM de cicloheximida (CH) al medio A. La tabla 3 muestra que la CH efectivamente inhibe la síntesis de proteínas en las levaduras. La tabla 4, muestra que 0.4 mM de CH no tiene efecto directo sobre los transportadores de aminoácidos.

Tabla 3. Efecto de la CH sobre la síntesis de proteínas. Las levaduras fueron preincubadas con 0.20 mM L-³H-leucina en el medio A más la condición que se indica durante una hora. La síntesis de proteínas está medida como cpm incorporadas al material insoluble bajo cada condición.

CH (mM)	Tiempo de preinc. (min)	cpm
0	0	1237
0.40	0	1685
0	60	20097
0.40	60	391

Tabla 4. Efecto de la CH sobre los transportadores de aminoácidos. Las levaduras fueron preincubadas por una hora en el medio A. Al cabo de ese tiempo se agregó L-H³-leucina junto con CH a las concentraciones que se indican; 3 min después se determinó la captación.

CH (mM)	Leu (mM)	V
0	0.10	460.2
0.40	0.10	546.0
0	0.50	1096.3
0.40	0.50	1107.0

RESULTADOS

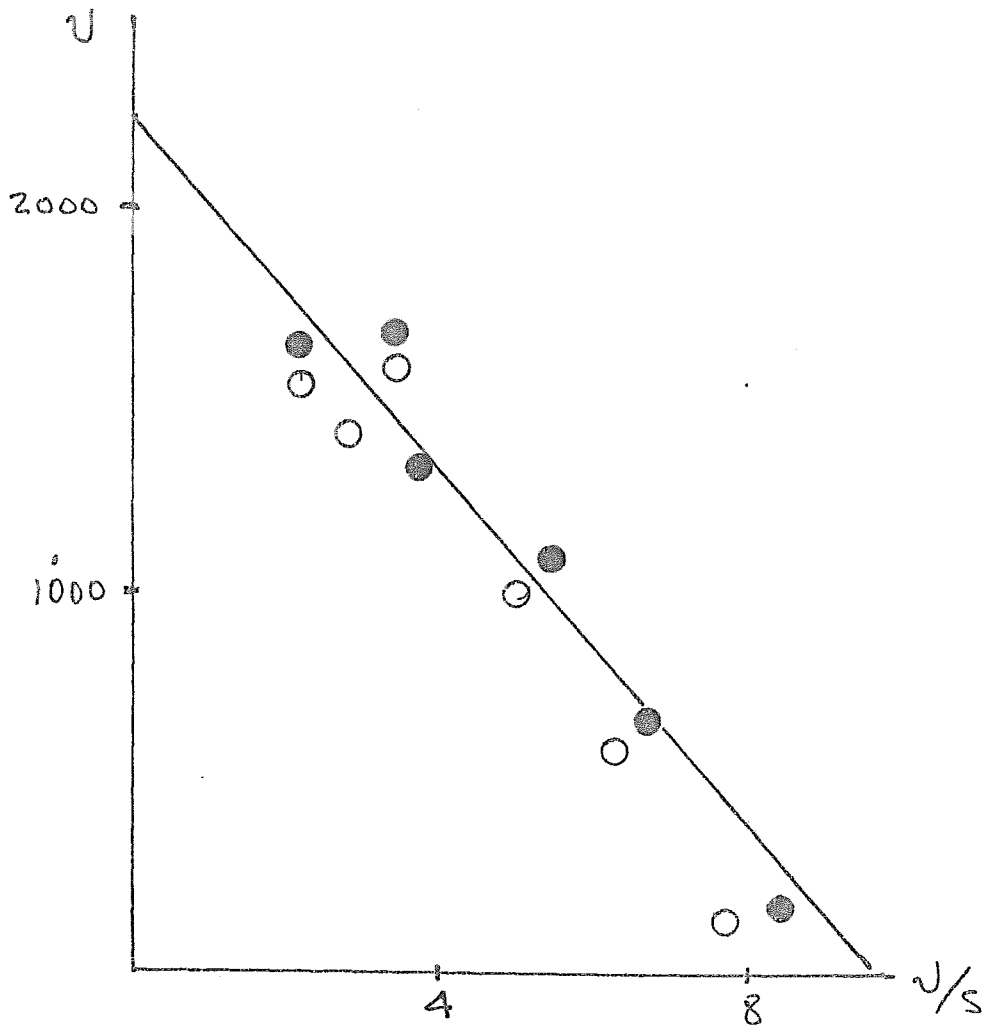
1. Estudios sobre la afinidad de los sistemas de transporte de aminoácidos.

Con el objeto de determinar si la entrada de leucina se lleva a cabo a través de la PG, dado que la citrulina es transportada por ese sistema (21), estudiamos su transporte en presencia de citrulina como inhibidor y viceversa. Los datos de la tabla 5, muestran la entrada de citrulina a las levaduras y que la leucina tiene un efecto inhibitorio sobre el transporte de citrulina mayor que el que este último produce sobre la leucina. Si la entrada de ambos aminoácidos fuera por la misma permeasa, este dato indicaría que la afinidad del sistema sería mayor por la leucina; Grenson reportó una K_m de 0.080 mM de la PG para la citrulina y nosotros una K_m de 0.215 mM del acarreador de leucina, por lo tanto los datos de la tabla 5 parecen indicar que la citrulina y la leucina no entran por la misma permeasa. En apoyo a esta conclusión, la fig. 2 muestra que 0.90 mM de citrulina no tuvo ningún efecto sobre la cinética del transporte de leucina.

Tabla 5. Inhibición del transporte de leucina por citrulina y viceversa. Las levaduras fueron preincubadas una hora en el medio A, al cabo de ese tiempo se agregó 0.10 mM de L-³H-leucina junto con citrulina a las concentraciones indicadas, o 0.080 mM de L-¹⁴C-citrulina junto con leucina. Tres min después se determinó el transporte.

Aminoácido inhibidor (mM)	% Inhibición de citrulina sobre leucina	% inhib. de leucina sobre citrulina
0	0	0
0.10	15	50
1.00	36	90

Fig. 2. Hofstee del transporte de leucina. Las levaduras fueron preincubadas por una hora en el medio A; al cabo de ese tiempo se agregó la L-³H-leucina (●) ó L-³H-leucina más 0.90 mM citrulina (○). Tres min después se determinó el transporte.



Dado que las observaciones anteriores no encajan dentro del

esquema propuesto por Grenson, decidimos estudiar la cinética del transporte de citrulina cubriendo un intervalo de concentraciones mucho más amplio que el abarcado por esta autora. En la fig. 3, se muestra que la gráfica de Hofstee del transporte de citrulina presenta dos componentes, lo que suele interpretarse como indicador de dos sistemas de transporte, o de un solo sistema con dos sitios de unión para el sustrato, siendo en general difícil distinguir entre esas dos posibilidades. La fig. 3, también muestra que el componente de alta afinidad por citrulina se elimina (se inhibe) al agregar 0.320 mM de leucina, por lo que decidimos estudiar su especificidad hacia otros aminoácidos. La tabla 6, muestra que el grupo de aminoácidos aniónicos, prolina y los aminoácidos azufrados prácticamente no inhiben al componente de alta afinidad del grupo de los a.a. neutros es capaz de inhibir pero en un porcentaje mucho menor que los a.a. catiónicos. Así, el componente de alta afinidad presenta la especificidad que es de esperarse de un transportador de aminoácidos básicos, esto no es difícil de entenderse si se recuerda que la estructura de la citrulina corresponde a la de un aminoácido básico.

Con el objeto de obtener información que nos permitiera distinguir entre la posibilidad de dos sistemas de transporte de citrulina o de uno solo con dos sitios de unión, decidimos estudiar el efecto del pH del medio al

componentes.

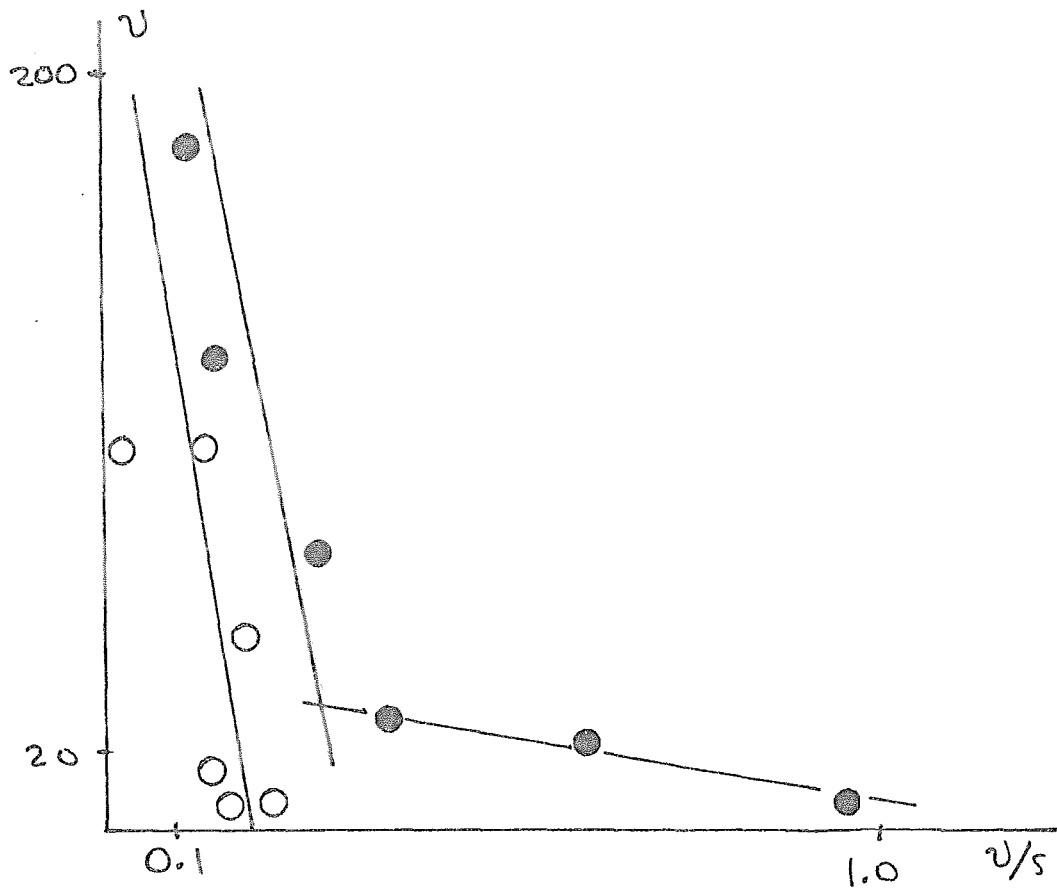


Fig. 3. Hofstee del transporte de Citrulina.

Las condiciones experimentales son las mismas que las indicadas en la fig 2. (●) L-¹⁴C-citrulina, (○) L-¹⁴C-citrulina más 0.320 mM Leu.

Tabla 6. Especificidad del componente de alta afinidad del transporte de citrulina. Las levaduras fueron preincubadas durante una hora en el medio A, al cabo de ese tiempo se les agregó 0.0150 mM de citrulina más 0.10 mM del aminoácido que se indica y se midió el transporte.

Aminoácido	% de inhibición	Aminoácido	% de inhibición
Ninguno	0	metionina	29
arginina	86	cisteina	6
histidina	96		
lisina	96	prolina	- 18
alanina	50	glutamato	24
leucina	40	aspartato	-20
triptofano	44		

En la fig 4, se observa que el compóne de alta afinidad por citrulina tiene una dependencia del pH marcadamente diferente de la que presenta el componente de baja afinidad, es obvio que este resultado por sí solo no se puede considerar como concluyente a favor de la existencia de dos permeasas diferentes para la citrulina, pero sumado a otro tipo de observaciones, puede resultar de utilidad para descartar alguna de las dos posibilidades que tenemos.

Como se mencionó en la introducción, se ha reportado que una gran variedad de sistemas de transporte muestran un aumento en su actividad al preincubar a las levaduras con glucosa (15); por lo tanto decidimos estudiar este aspecto de la entrada de citrulina, con el objeto de ver si existian diferencias entre sus dos componentes durante este proceso.

La fig.5, muestra que al igual que sucede con la leucina y otros aminoácidos (15, 38, 39), el transporte de citrulina se incrementa considerablemente al preincubar a las células con glucosa, y que el curso temporal de esta estimulación es el mismo para los dos componentes del transporte. Podría pensarse que este dato constituye una evidencia en contra de la hipótesis de dos sistemas distintos para la citrulina. Sin embargo, Kotyk ha mostrado que sistemas de transporte distintos pueden presentar un curso temporal de estimulación por glucosa semejante (15). Este dato por si solo entonces, tampoco puede tomarse como concluyente

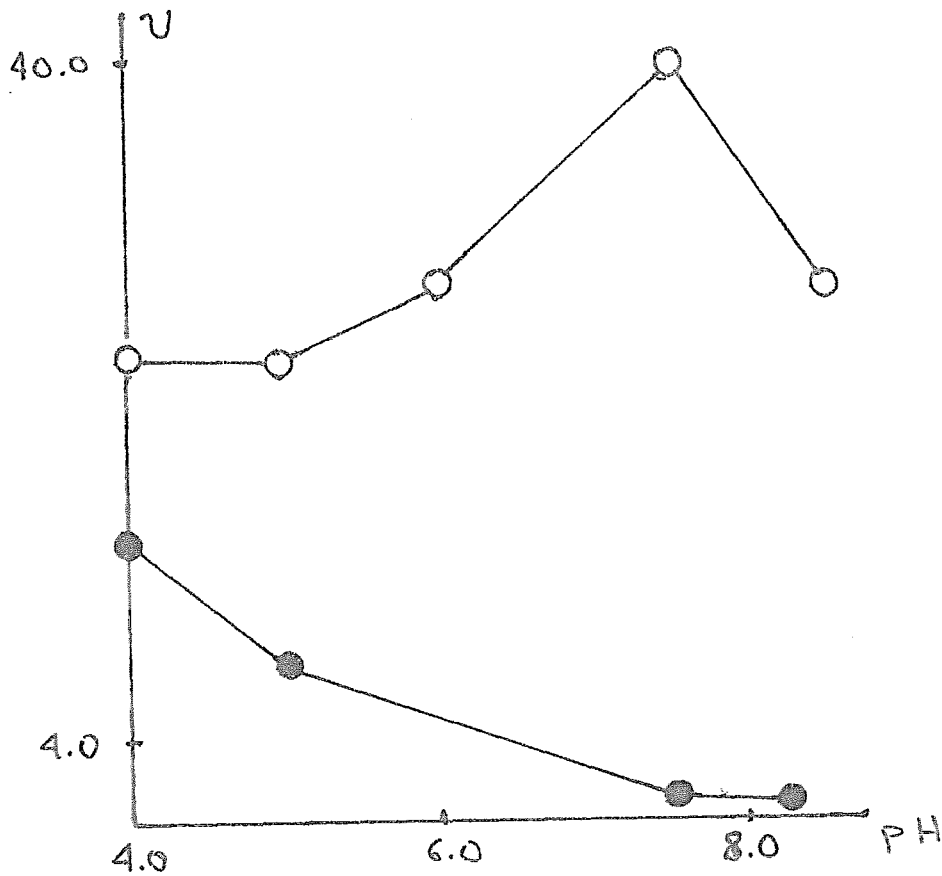


Fig.4. Efecto del pH al momento del transporte sobre la captación de citrulina a través de sus dos componentes. Las levaduras fueron preincubadas en el medio A durante una hora; al término de este tiempo se lavaron dos veces por centrifugación durante 5 min; después fueron resuspendidas en un medio con glucosa 150 mM y un buffer variable 40 mM según el valor de pH indicado en el eje de las abscisas, con 0.03 mM Cit* (●) ó con 1.5 mM Cit* + 1 mM Leu (○) y 3 min después se determinó la captación.

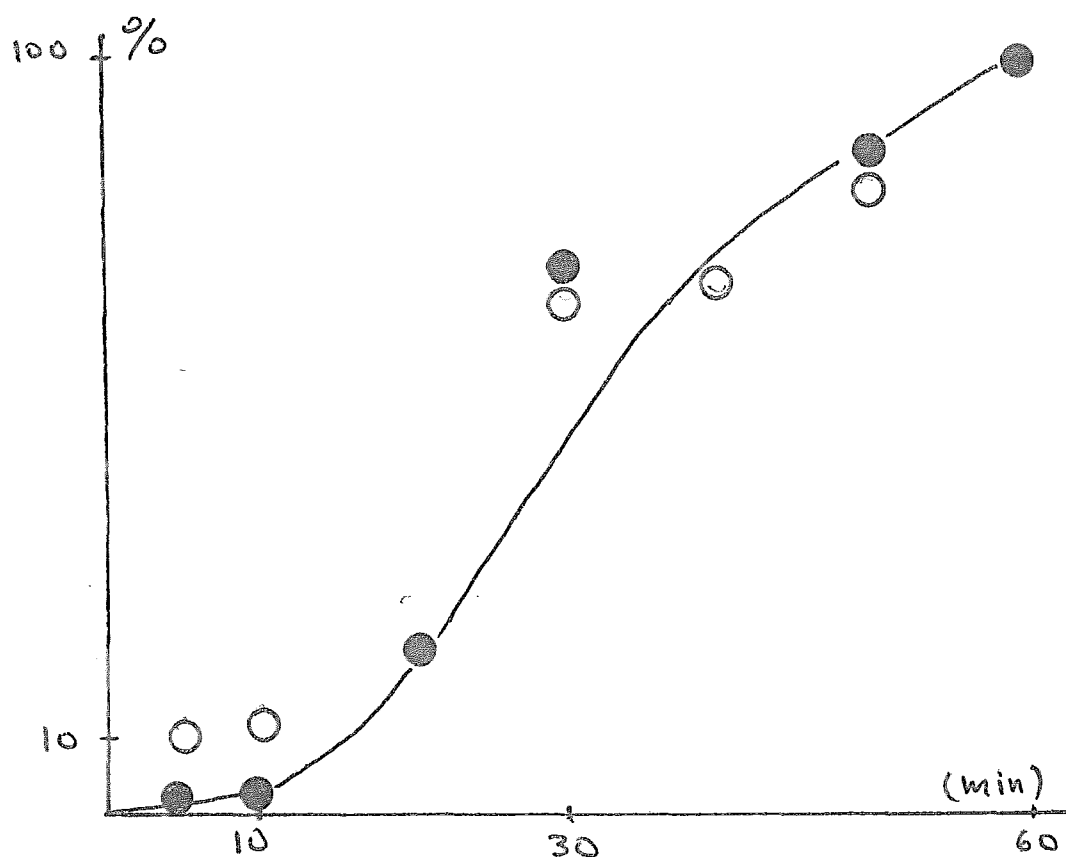


Fig.5. Curso temporal de la estimulación por glucosa del transporte de citrulina. Las levaduras fueron preincubadas en el medio A por los tiempos indicados en el eje de las abcisas, hecho esto se agregó 0.03 mM de Cit* (●) ó 1.5 mM Cit* + 1 mM Leu (○) y 3 min después se midió el transporte. Los resultados están expresados como el porcentaje de los valores obtenidos a los 60 min.

2. Papel de los cationes monovalentes en el transporte de aminoácidos.

Así, decidimos abocarnos al otro objetivo de este estudio, el del papel de los cationes monovalentes en el transporte de aminoácidos, con el propósito adicional de que al hacerlo, en forma paralela pudiéramos ir obteniendo información en relación con las opciones cinéticas del transporte de citrulina.

Como se mencionó en la introducción, hemos encontrado que la preincubación con K^+ estimula el transporte de leucina (39). Por ello, se buscó estudiar la generalidad de dicho efecto sobre la entrada de aminoácidos a la levadura, y dado que los resultados cinéticos que hemos mostrado en relación con el transporte de leucina y citrulina no encajan dentro del esquema propuesto por Grenson, decidimos estudiar este aspecto utilizando un representante de cada grupo de aminoácidos a saber : leucina, citrulina y aspartato.

La fig. 6.A, muestra que la preincubación de las levaduras en presencia de K^+ estimula notablemente tanto el transporte de leucina como el de citrulina y el de aspartato; por lo que este efecto es probablemente general en el transporte de aminoácidos en estas células. Por otra parte, la fig. 6.B, comprueba los reportes de la literatura de que el NH_4^+ inhibe el transporte de leucina y citrulina, pero además muestra que no tiene ningún efecto sobre el transporte de

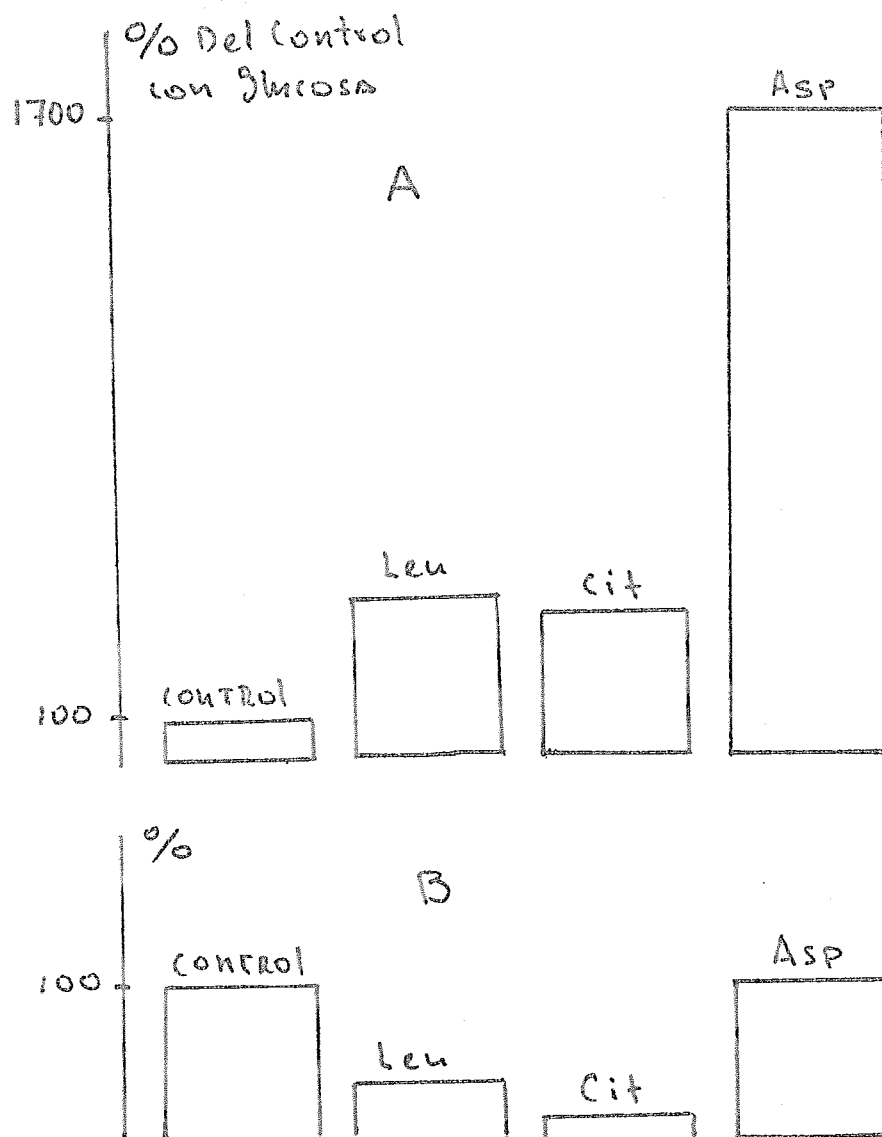


Fig.6. Efecto del K^+ y del NH_4^+ sobre el transporte de aminoácidos. Las levaduras fueron preincubadas por una hora en el medio A (control) ó en el medio A + 10 mM KCl (A) o en el medio A + 10 mM NH_4^+ (B), al término de este tiempo se agregó el aminoácido indicado a la concentración de 0.080 mM y 3 min después se midió el transporte.

aspartato, por lo que a diferencia de la estimulación por K^+ , la inhibición por NH_4^+ no es una característica general del transporte de aminoácidos en las levaduras.

En la figura 7, se muestra que el efecto del amonio en la actividad de las permeasas, tiene las siguientes características:

- 1) Como se ha reportado en la literatura, en la inhibición ejercida por el NH_4^+ interviene un elemento de inactivación
- 2) Como se preveía de la fig. 6.B, el NH_4^+ en estas condiciones no tuvo ningún efecto sobre el transporte de aspartato. Los valores elevados de captación de este aminoácido observados a los 35 min, probablemente se deben a que a esos tiempos la CH dejó de tener efecto sobre la síntesis de proteínas.
- 3) El curso temporal de la inactivación por NH_4^+ , es el mismo para la leucina y la citrulina, a pesar de que como hemos visto entran a las levaduras por sistemas diferentes, lo cual no resulta extraño si consideramos que el NH_4^+ inhibe una gran variedad de permeasas distintas a través de elementos genéticos comunes.
- 4) El curso temporal de la inactivación por NH_4^+ , fue un poco más lento tanto para citrulina como para leucina cuando las levaduras habían sido preincubadas con K^+ : así mismo, los valores finales de transporte (a los 40 min) fueron mayores. Por lo tanto, parece que la preincubación con K^+ protege en cierta medida a las levaduras contra el efecto inactivador del NH_4^+ sobre el transporte de

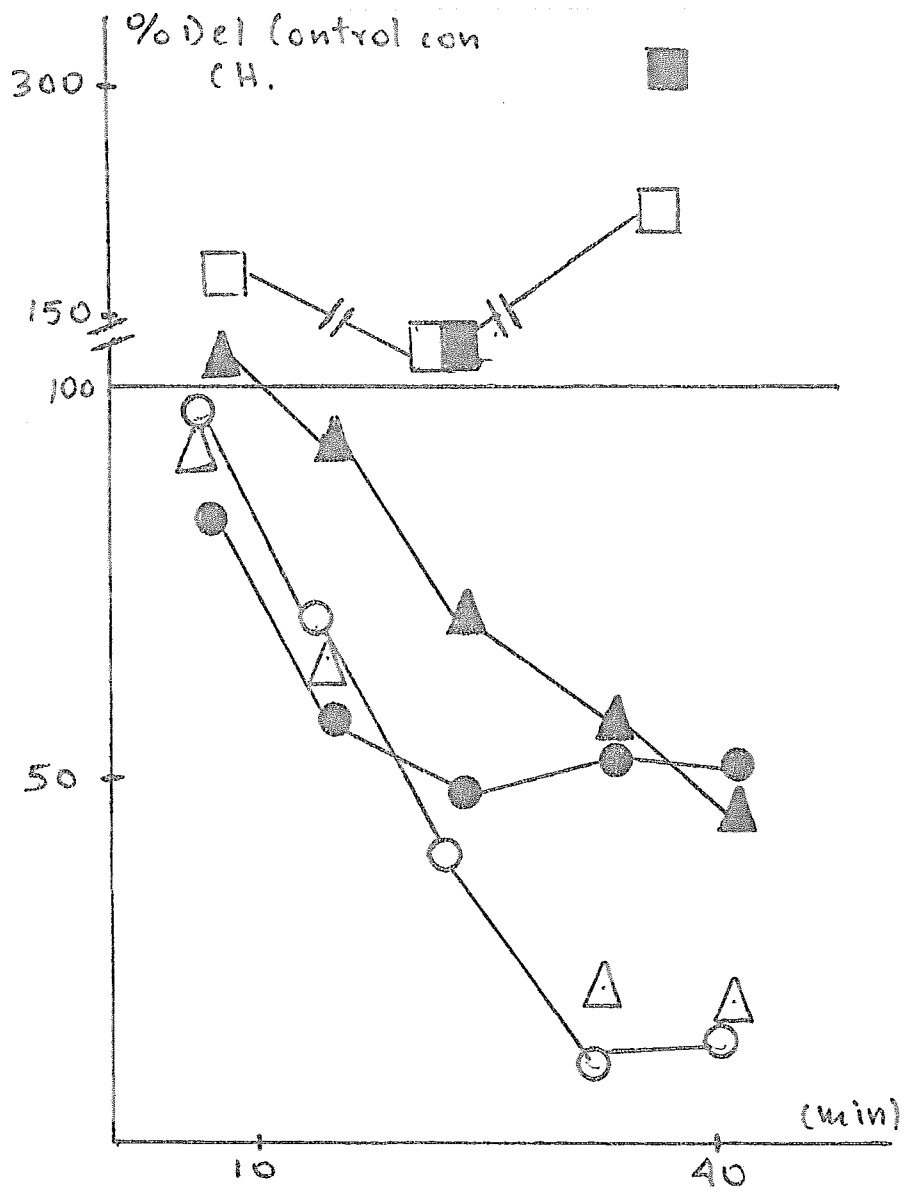


Fig.7. Efecto del NH_4^+ sobre la actividad de las permeasas de aminoácidos, en ausencia de síntesis de proteínas. Las células fueron preincubadas por una hora en el medio A (figuras vacías) ó en el medio A + 10 mM KCl (figuras llenas), al término de este tiempo se lavaron dos veces por centrifugación y al tiempo cero se resuspendieron en el medio A + 0.40 mM CH (control) o en el medio A + 0.40 mM CH + 10 mM NH_4^+ y a los tiempos indicados se agregó 0.080 mM del aminoácido correspondiente determinandose el transporte 2 min después. Los valores obtenidos sin NH_4^+ se promediaron para cada caso y se tomaron como el 100 %. O - Cit., Δ - Leu., □ - Asp.

aminoácidos.

Con base en lo anterior, decidimos estudiar el efecto de la preincubación de las levaduras en presencia de K^+ y NH_4^+ en cantidades equimolares. La fig.8, muestra que :

1) En todo el intervalo de concentraciones probado, la preincubación con K^+ estimuló el transporte de citrulina a través de su componente de baja afinidad, en tanto que la preincubación con NH_4^+ lo inhibió.

2) Tanto el efecto estimulador del K^+ , como el inhibitorio del NH_4^+ presentan saturación a concentraciones altas de ambos cationes (por arriba de 10 mM).

3) Cuando las levaduras son preincubadas en presencia de cantidades equimolares de K^+ y NH_4^+ , los efectos que estos iones producen por sí solos, se cancelan mutuamente.

Cabe señalar que estos mismos resultados se obtuvieron para el transporte de citrulina a través de su componente de alta afinidad, así como para el transporte de leucina (datos no mostrados), por lo que es probable que sean comunes a todas aquellas permeasas inhibibles por NH_4^+ .

Los datos presentados en las figs 7 y 8 parecen indicar que existen elementos comunes en el mecanismo de estimulación del K^+ y el de inhibición por NH_4^+ , esto nos motivó a estudiar más detalladamente las características del efecto del K^+ , así que, primero decidimos estudiar su especificidad mediante el empleo de otros cationes del primer grupo de la Tabla Periódica, los metales alcalino-terreos. La fig.9, muestra que al menos por lo que toca al transporte de leucina, el efecto estimulador del K^+ es altamente

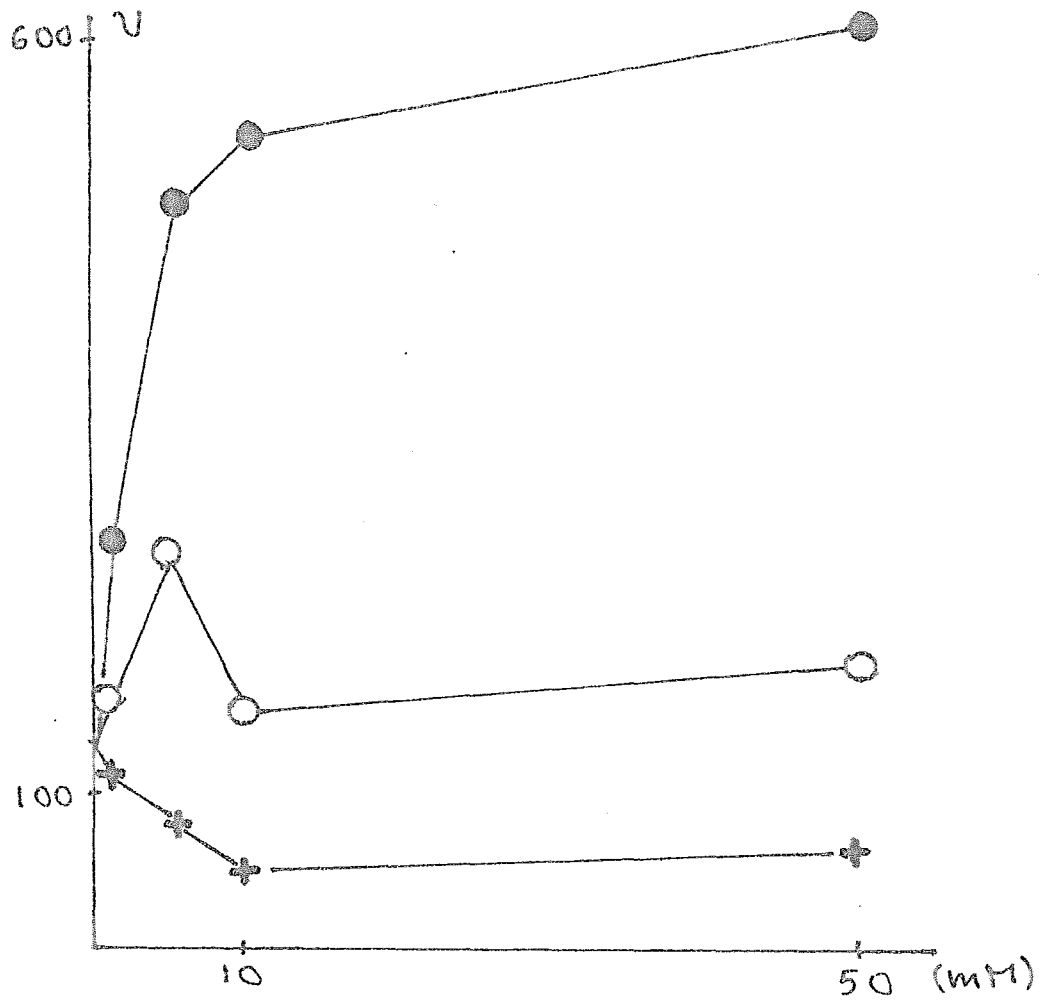


Fig.8. Efecto de distintas concentraciones de K^+ y/o NH_4^+ sobre el componente de baja afinidad por Cit. Las levaduras fueron preincubadas por una hora en el medio A más KCl (●) ó NH_4^+ (+) ó KCl + NH_4^+ (○) a la concentración total de los cationes que se indica en el eje de las abcisas, transcurrido ese tiempo se agregó 1.5 mM Cit* + 1 mM Leu y 2 min después se midió la captación.

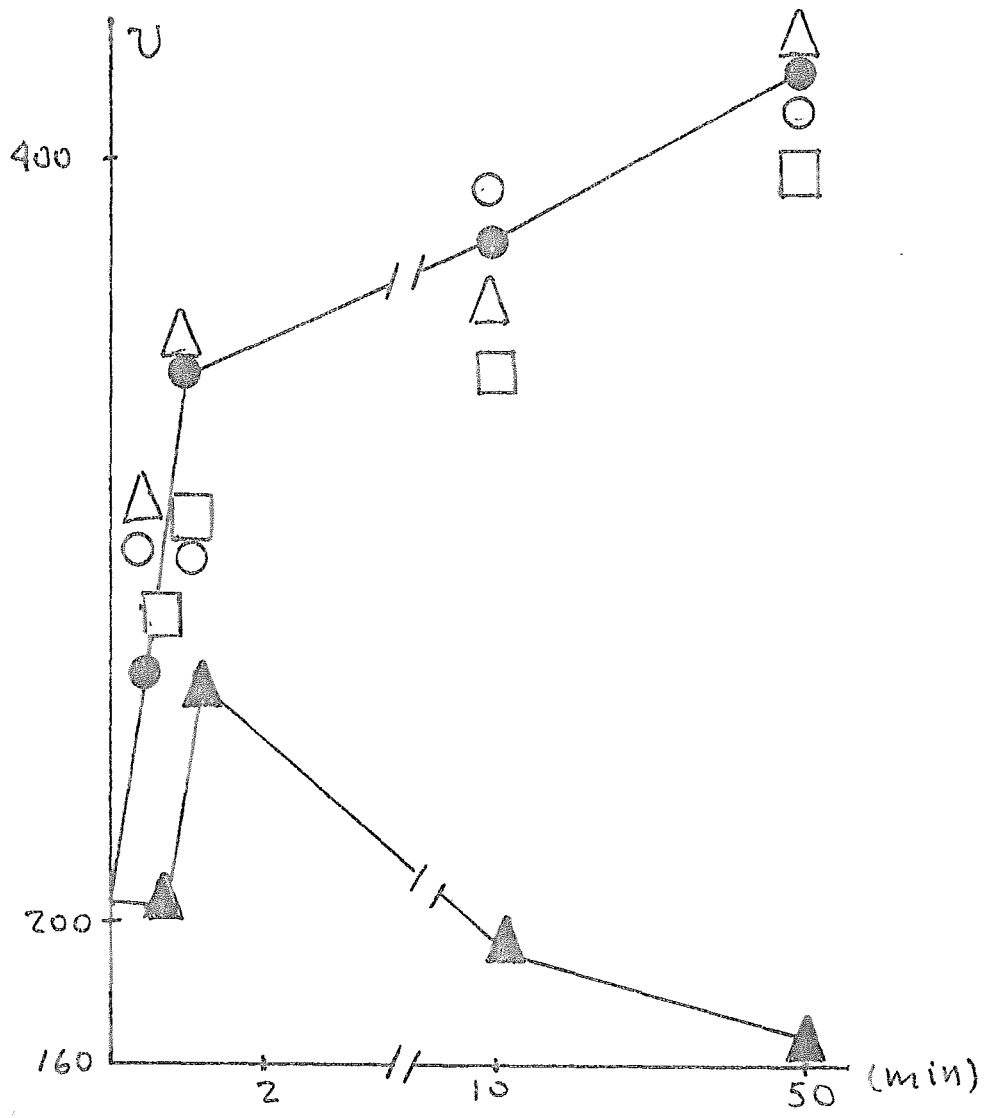


Fig.9. Efecto de distintos cationes monovalentes sobre la entrada de leucina. Las células se preincubaron una hora en el medio A con distintas sales a las concentraciones que se indican, al término de este tiempo se agregó L-³H-Leu y 3 min después se midió la captación. ● KCl, □ NaCl, ▲ LiCl, △ CsCl, ○ RbCl.

inespecífico; obteniéndose resultados casi idénticos con Rb^+ , Cs^+ , y Na^+ , la única excepción fué el Li^+ , el cual no tuvo el mismo efecto que los otros cationes; en relación a la inespecificidad de este efecto, es importante señalar que los mismos resultados que se muestran en la fig.8, se obtuvieron para el transporte de leucina cuando el K^+ se sustituyó por Na^+ (datos no mostrados).

La fig.10, muestra que el curso temporal de la estimulación por K^+ , tiene las siguientes características :

- 1) Tiene forma sigmoideal, aunque esto es menos claro para el transporte de leucina que para el de citrulina (fig 10.B).
- 2) Aunque de forma sigmoideal, tanto la velocidad como el porcentaje de estimulación son distintos para los dos componentes de la entrada de citrulina, lo cual apunta en el sentido de que estos corresponden a dos sistemas de transporte distintos (fig.10.A)

La forma sigmoideal de la estimulación por K^+ , indica que su efecto no comienza a darse de forma inmediata, sino que requiere de un periodo de latencia que es distinto para cada aminoácido.

Con el objeto de obtener evidencias respecto a si el aumento observado en el transporte se debe a que hay un aumento en el número de permeasas y/o un aumento en la actividad de estas, se procedió a estudiar si el K^+ era capaz de incrementar la entrada de aminoácidos en ausencia de síntesis de proteínas. La fig.11, muestra que :

- 1) Para que el K^+ sea capaz de incrementar en forma efectiva

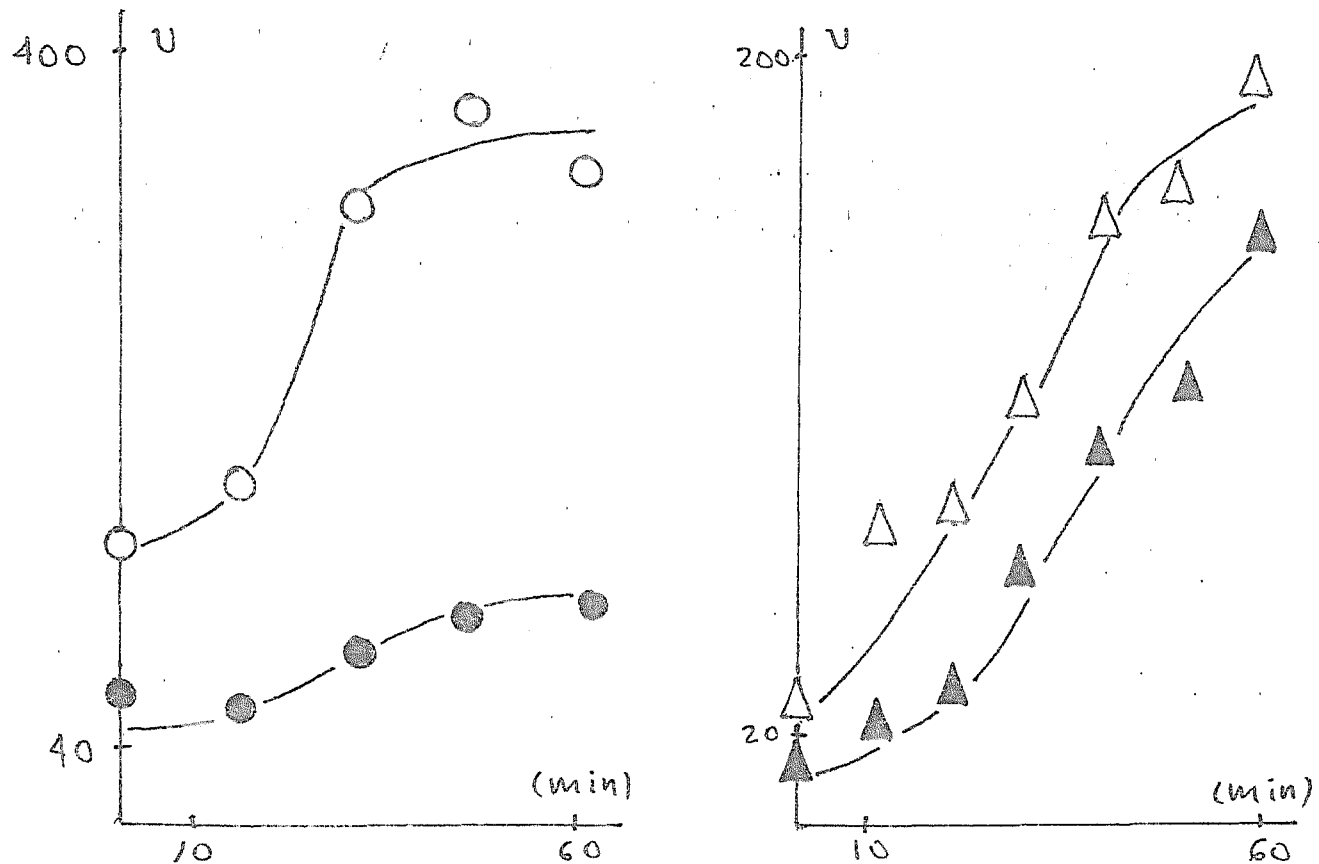


Fig.10. Curso temporal de la estimulación por K^+ . Las levaduras fueron preincubadas durante una hora en el medio A y dentro de esta hora, estuvieron con KCl 10 mM los tiempos que se indican en el eje de las abcisas. Al cabo de la hora de preincubación, se agregó : 0.015 mM Cit^* (●), 1.5mM Cit^* + 1mM Leu (○), 0.08 mM Leu^* ó 0.08 mM Asp^* y 2 min después se determinó la captación.

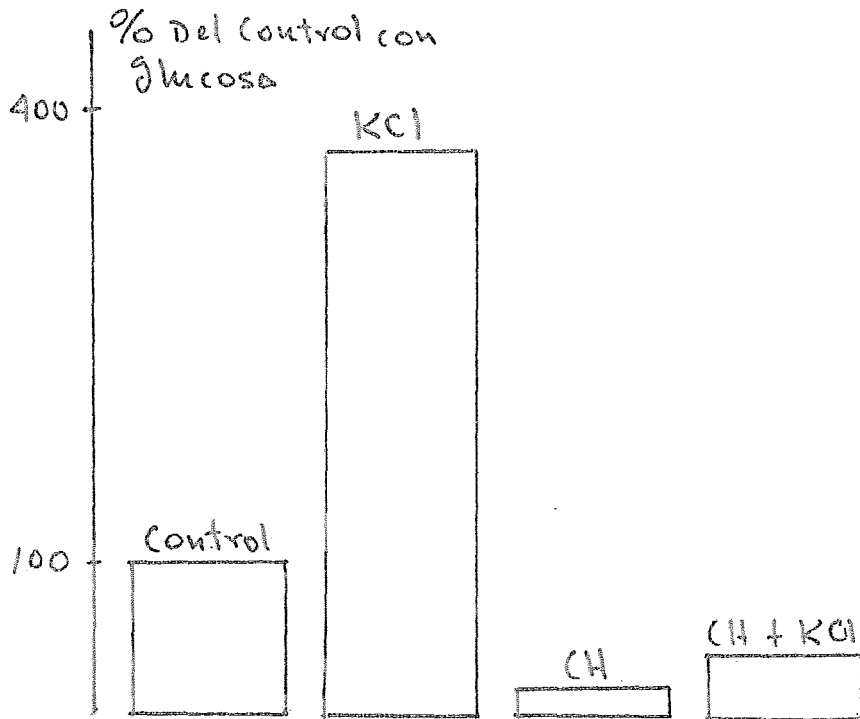


Fig.11. Efecto de preincubar con K^+ en ausencia de síntesis de proteínas. Las condiciones experimentales son las mismas que se indican en la fig.6, sólo que ahora se preincubó con 0.4 mM CH, 10 mM KCl ó 10 mM KCl + 0.4 mM CH según se indica. La concentración de Cit* fué de 0.015 mM.

64
la captación de citrulina a través del componente de alta afinidad, se requiere que las levaduras sean capaces de sintetizar proteínas (comparense los valores respecto al control con glucosa); sin embargo :

2) La entrada de citrulina a células preincubadas con CH más K^+ , fue mayor que en las células preincubadas solo con CH; el K^+ ejerce un ligero efecto activador que no es suficiente para explicar su estimulación del transporte.

Resultados análogos se obtuvieron para la entrada de citrulina a través de su componente de baja afinidad así como para la leucina (datos no mostrados).

Este mismo aspecto de la estimulación por K^+ , fue estudiado en células que habían sido preincubadas con glucosa o con glucosa más K^+ antes de la adición de la CH, con el objeto de que al obtener de esta manera captaciones más elevadas, pudiéramos distinguir con más claridad la importancia de la activación por el K^+ observada en la fig.11. La fig. 12, muestra que:

1) El K^+ tiene un efecto activatorio sobre el transporte de citrulina y aspartato, independientemente de si las levaduras fueron preincubadas con ó sin K^+ ; además:

2) En el caso de la leucina, no es posible hablar de un efecto activador en el proceso de estimulación por el K^+ .

Así, de los datos presentados en las figs.11 y 12 se tiene que, al menos por lo que toca al transporte de citrulina y aspartato, el efecto del K^+ tiene un componente de activación, pero en las levaduras que no han sido preincubadas con glucosa y que por lo tanto de acuerdo con

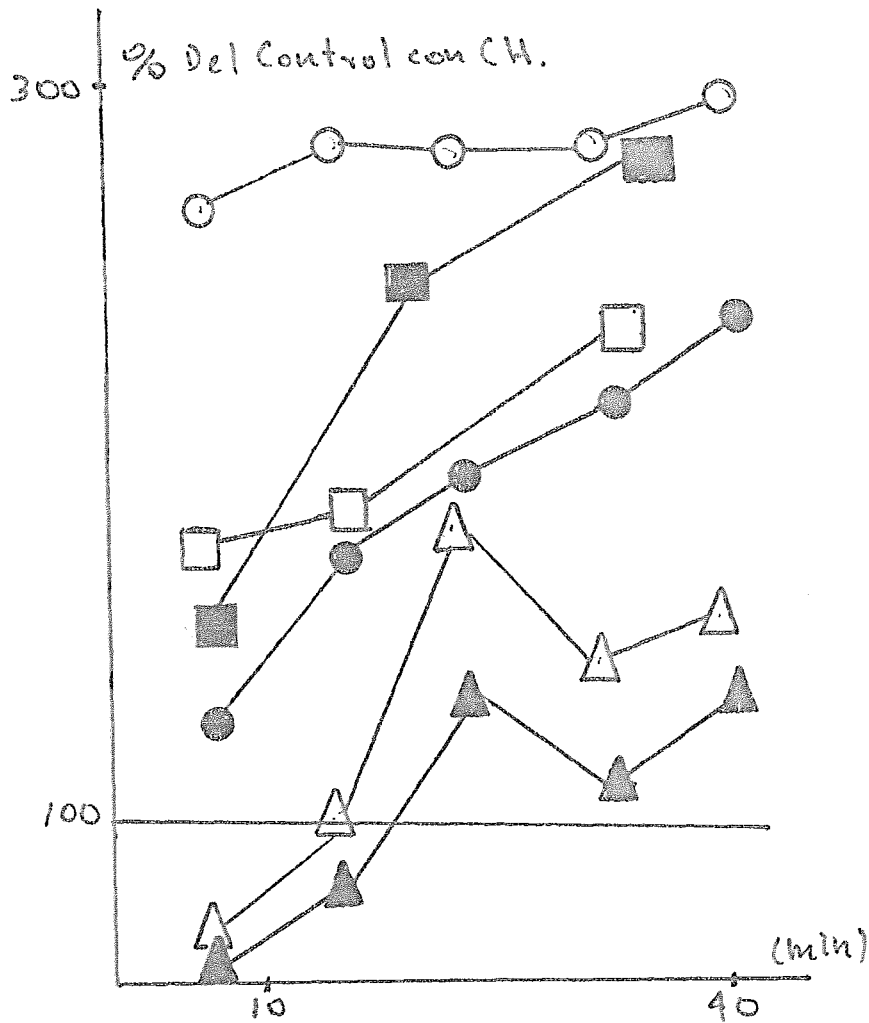


Fig.12. Efecto del K^+ sobre la actividad de las permeasas de aminoácidos. Las condiciones experimentales son las mismas que las de la fig.7. excepto que ahora en vez de NH_4^+ se agregó KCl 10 mM. ○ - Cit, △ - Leu, □ - Asp.

Kotyk (15) no tienen un número suficientemente grande de acarreadores en la membrana, el componente de activación por el K^+ es mínimo. Para observar una estimulación significativa es necesario, el que haya síntesis de proteínas.

Por este motivo, decidimos estudiar el efecto del K^+ sobre la síntesis de proteínas. La fig.13, muestra que el K^+ no tiene ningún efecto ni sobre la velocidad ni sobre los valores finales alcanzados (a una hora) en la síntesis general de proteínas que tiene lugar cuando las levaduras son puestas en presencia de glucosa.

Como se mencionó en la introducción, Peña encontró que la elevación del pH del medio produce el mismo efecto metabólico que la adición de K^+ a pH del medio bajo, y que el K^+ a pH alto no produce ningún efecto sobre el metabolismo; por este motivo decidimos estudiar el efecto del pH del medio durante la preincubación sobre el transporte de aminoácidos, y compararlo con el resultado obtenido al preincubar a pH 6.0 (como siempre) en presencia de K^+ , con la esperanza de que esto nos daría más información sobre el mecanismo por el cual el K^+ estimula la entrada de aminoácidos. La fig.14 muestra que en el caso del transporte de citrulina, es equivalente preincubar a pH 6.0 con K^+ que preincubar a pH alto (pH 8.5) sin K^+ . Dado que el poner a las levaduras a pH alto sin K^+ ó a pH bajo con K^+ produce en ambos casos una alcalinización del interior celular, el resultado anterior parecería indicar que la

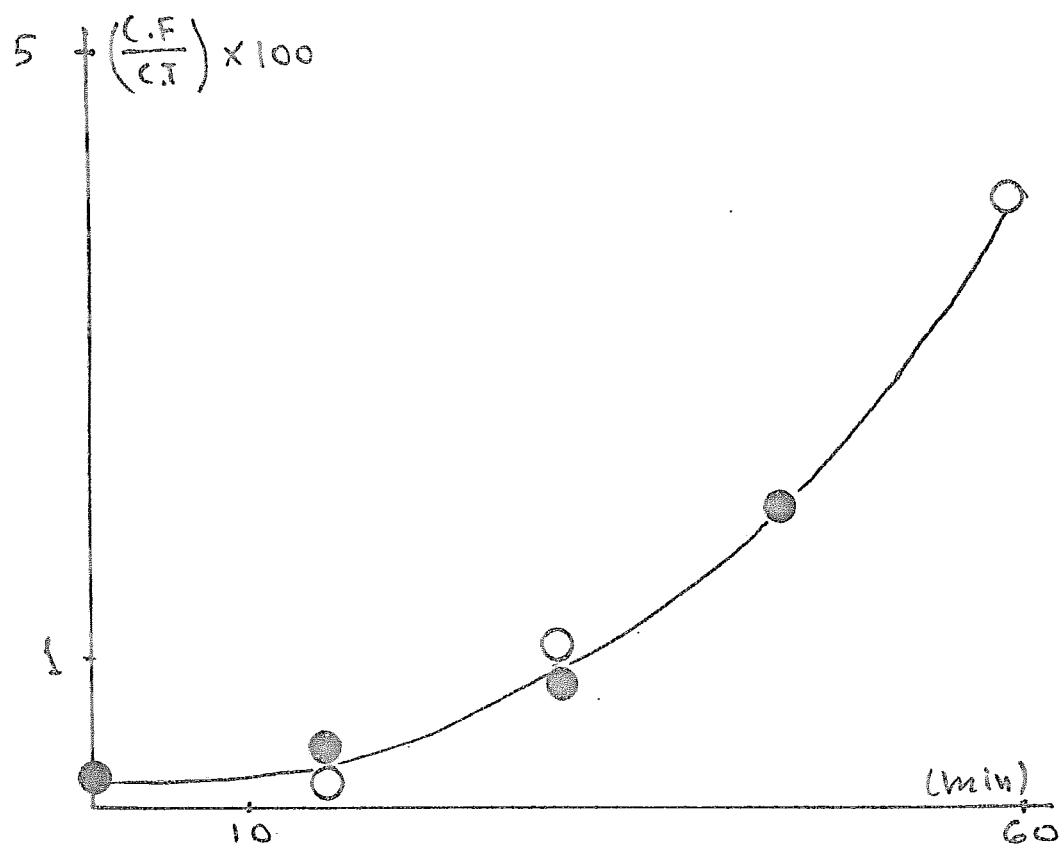


Fig.13. Efecto del K^+ sobre la síntesis de proteínas.

Las levaduras fueron preincubadas en el medio A (O) ó en el medio A + 10 mM KCl (●) y a los tiempos señalados se midió la síntesis de proteínas de acuerdo a lo señalado en la sección de materiales y métodos.

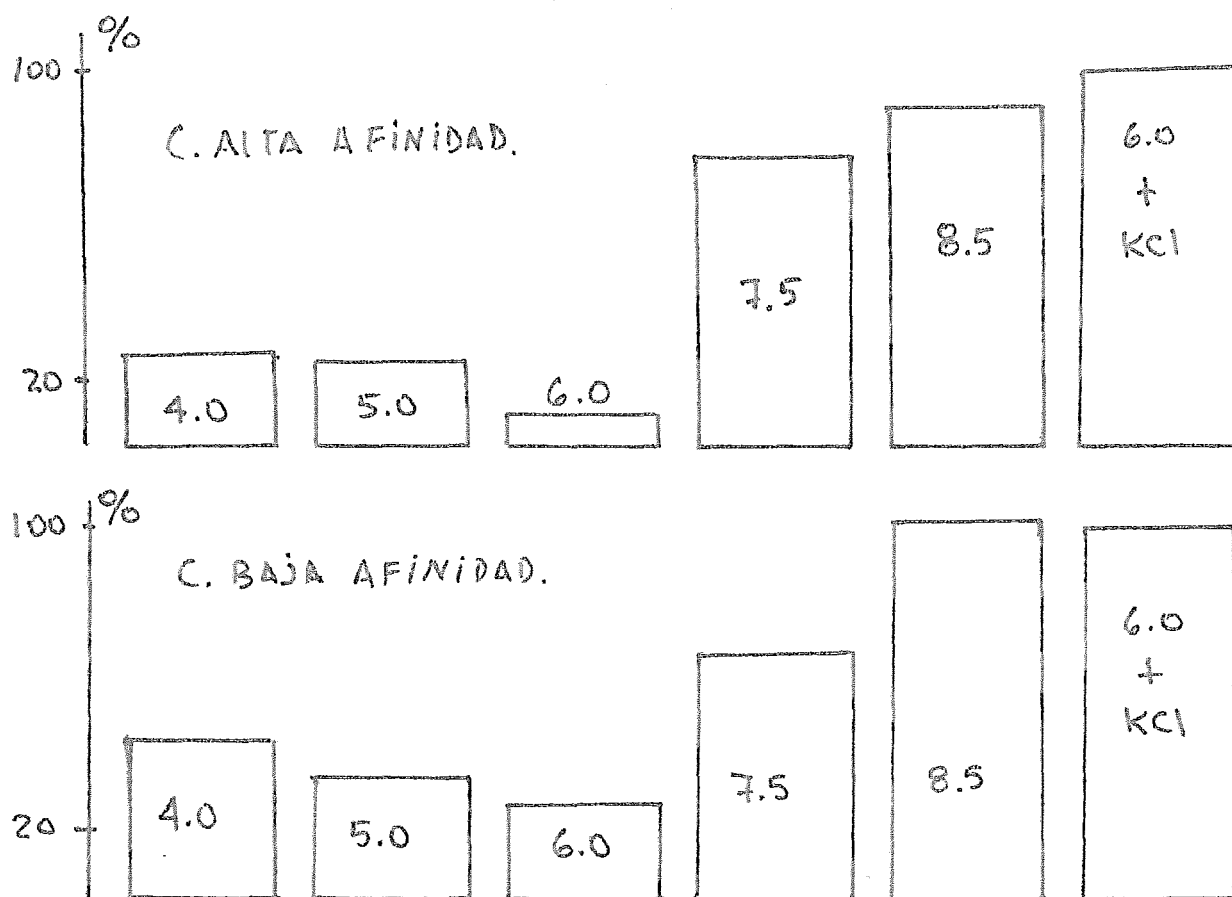


Fig.14.Efecto del pH del medio de preincubación sobre el transporte de citrulina. Las levaduras fueron preincubadas por una hora con glucosa 150 mM y un buffer 20 mM variable según los valores de pH que se indican. Al cabo de este tiempo, las células se lavaron 2 veces por centrifugación y se resuspendieron en el medio A (pH 6.0) + 0.03 mM Cit* (componente de alta afinidad) ó en el medio A + 1.5 mM Cit* + 1 mM Leu (componente de baja afinidad) y a los 2 min se determinó el transporte. Los resultados están expresados como por ciento del valor obtenido en cada caso preincubando en el medio A + 10 mM KCl.

señal que dispara la estimulación del transporte es la alcalinización inicial producida por el K^+ ; sin embargo hemos encontrado también, que a pH del medio alto (8.5) el K^+ es capaz de estimular aún más el transporte, por lo que el mecanismo en ambos casos debe ser distinto (datos no mostrados).

Análisis Teórico. Gráficas de Unión.

En esta parte del trabajo se representaran, dentro del marco de la termodinámica de circuitos, dos aspectos del transporte de aminoácidos en las levaduras, a saber:

- 1) El cotransporte con protones, y
- 2) Su estimulación por potasio.

Cotransporte aminoácido-protones:

Debido a que ha sido ampliamente estudiado (30-33, 36), el cotransporte con protón no fue abordado experimentalmente en este estudio; sin embargo, ya que es uno de los aspectos centrales del mecanismo de entrada de los aminoácidos, cualquier modelo que trate de la captación de estas moléculas deberá, necesáriamente, de incluirlo como una de sus partes. Así, la elaboración de una gráfica de unión que dé cuenta de la fase de cotransporte con protones, constituye el primer paso para el análisis dentro de la termodinámica de circuitos de distintos aspectos del transporte, uno de los cuales es su estimulación por el potasio.

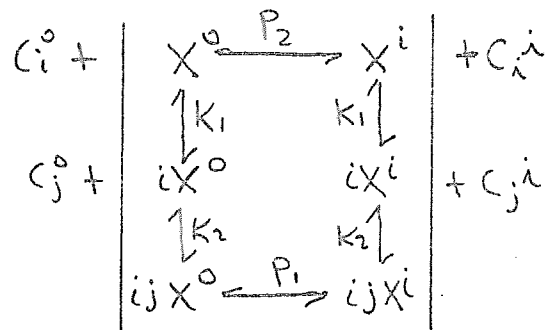
En la elaboración de la gráfica y en el tratamiento de las ecuaciones que de ella se deriven, deben tomarse en cuenta los siguientes resultados experimentales:

- 1) La captura de los aminoácidos es acompañada por la entrada acoplada de 1 a 3 H^+ , siendo la estequiometría variable según el aminoácido, la especie de las levaduras y su condición metabólica (32, 36).

2) De acuerdo con el grupo de Slaymann (36), el cambio en el pH del interior celular que produce la entrada de los protones sigue un curso temporal lento de modo que, durante el tiempo que dura un ensayo de transporte (1 a 3 min), podemos considerar a la concentración intracelular de H⁺ como prácticamente constante.

3) El transporte de aminoácidos, generalmente, presenta cinéticas del tipo de Michaelis-Menten (39).

Ahora bien, comunmente con el objeto de obtener la cinética de un proceso de transporte se suele considerar, en forma esquemática, que tanto el acarreador libre como el unido a sus sustratos, puede difundir a través de la membrana, así por ejemplo, Schultz (50) da el siguiente esquema cinético para un proceso de cotransporte:



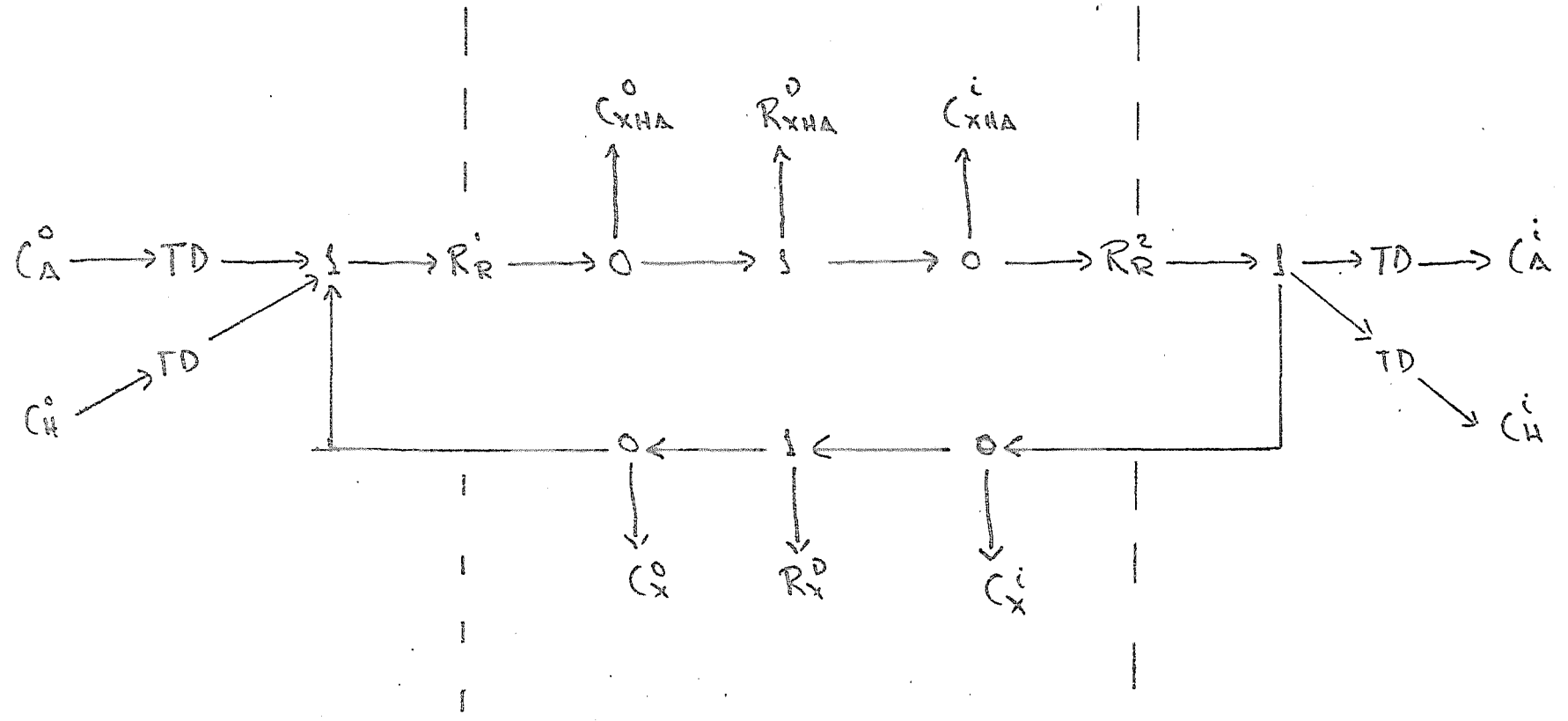
Donde K₁, K₂ son las constantes de equilibrio de las reacciones de asociación y disociación de los complejos, y P₁, P₂ son las constantes de velocidad de los procesos de "difusión" en la membrana. Se esta considerando, además, que la union de los sustratos con el acarreador sigue un orden específico, en este caso, primero se une "i" y luego "j".

Por lo que, estableciendo un paralelismo con estos modelos cinéticos, la gráfica de union para el cotransporte con protones, debe de incluir:

- 1) La consideración de un orden para la union de los protones y el aminoácido con el acarreador.
- 2) Las reacciones de formación y descomposición de los distintos complejos.
- 3) Los procesos de difusión o translocación del acarreador tanto en su forma libre como unido a sus sustratos (ligandos).

El cotransporte H^+ -aminoácido en las levaduras, aún no se ha estudiado a nivel molecular, y por lo tanto no existen suficientes datos como para asignar un determinado orden a la union de estos con el acarreador. Así, consideraremos tres gráficas de union, una en que no se tomará en cuenta el orden de union de los ligandos con el acarreador, otra en la que se supondrá que primero se unen los protones con el acarreador y después el aminoácido en el lado externo de la membrana, saliendo primero el aminoácido y luego los protones en el interior celular, y finalmente el caso inverso; con el objeto de compararlas y elejir lo más conveniente para incluir el efecto del potasio.

Tomando en cuenta la discusión anterior, la gráfica del cotransporte en la que no se toma en cuenta el orden de union de los ligandos, toma la siguiente forma:



Los superíndices "o" e "i", se refieren al lado externo y al interno de la membrana respectivamente; la región comprendida entre las líneas punteadas, da cuenta de los procesos que se verifican dentro de la membrana.

Las capacitancias C_A^o, C_H^o y C_A^i, C_H^i representan la acumulación de los aminoácidos A y los protones H en los lados externo e interno de las células. Durante el transporte C_A^o, C_H^o se están descargando; en tanto que C_A^i, C_H^i se están cargando.

La resistencia reactiva Rr^1 , representa la disipación de la reacción correspondiente a la formación del complejo XHA entre el acarreador, el aminoácido y los protones en el lado externo de la membrana.

C_{XHA}^o, C_{XHA}^i y C_X^o, C_X^i representan la acumulación local del acarreador libre X y del complejo XHA dentro de la membrana. La resistencia difusiva R_{XHA}^D , representa la disipación por la translocación del complejo XHA en la membrana.

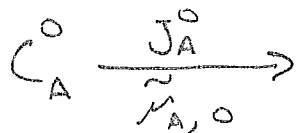
R_X^D , representa la disipación por la translocación de los sitios activos del acarreador.

Los transductores TD, tienen por objeto introducir la estequiometría del flujo del aminoácido con los protones, como ya se ha señalado, esta es variable con valores estimados que van de 1 a 3 H^+ por aminoácido. Por lo tanto, con el objeto de simplificar el modelo, consideraremos una estequiometría de uno a uno, con lo cual podemos eliminar a los transductores de la gráfica.

Finalmente, antes de escribir la gráfica de unión con sus flujos asociados, es necesario hacer las siguientes

alcaraciones:

La capacitancia C_A^0 , representa al aminoácido A con un potencial electroquímico en el lado externo de la célula $\tilde{\mu}_{A,0}$ y al darse el transporte, de este elemento sale un flujo J_A^0



Ahora bien, la ecuación constitutiva (velocidad de reacción) de por ejemplo la resistencia Rr^1 , esta dada por:

$$v_1 = R_1 (X)^0 (A)^0 (H)^0 - R_{-1} (XHA)^0$$

esto es, v_1 está escrita en términos de las concentraciones de los participantes en la reacción, por lo tanto, en vez de poner al potencial $\tilde{\mu}_{A,0}$ asociado con C_A^0 es conveniente poner la concentración de A en el lado externo $(A)^0$. Esto no representa ningún inconveniente ya que $(A)^0$ puede considerarse como equivalente a $\tilde{\mu}_{A,0}$, pues para una solución diluida:

$$\tilde{\mu}_{A,0} = \mu_{A,0}^0 + RT \ln (A)^0 + z_A \chi \psi^0$$

$$\Leftrightarrow (A)^0 = \exp \left[(\tilde{\mu}_{A,0} - \mu_{A,0}^0) / RT \right] \exp \left[(-z_A \chi \psi^0 / RT) \right]$$

$$\text{ó si } z_A = 0 \Rightarrow (A)^0 = \exp \left[(\tilde{\mu}_{A,0} - \mu_{A,0}^0) / RT \right]$$

Esta aclaración, vale también para el proton y el acarreador, respecto a este último, cabe señalar que puede llevar carga eléctrica neta ya sea cuando esta unido a sus sustratos o cuando se encuentra libre, por ejemplo, el transportador de lactosa en E.coli se sabe que tiene una carga neta negativa cuando se encuentra libre (51). En las levaduras, no disponemos de información que nos permita asignar carga eléctrica al acarreador en alguno de sus distintos estados.

Así, habiendo hecho estas aclaraciones, la gráfica de union para el cotransporte aminoácido-proton sin tomar en cuenta el orden de formación del complejo entre el acarreador y sus ligandos, queda finalmente como:

Considerando relaciones constitutivas lineales para los elementos de la gráfica, tenemos:

--Ecuaciones capacitivas

$$(J_A^0 - J_{XHA}) = C_{XHA}^0 \frac{\delta U_f^0}{\delta t}$$

$$(J_{XHA} - J_A^i) = C_{XHA}^i \frac{\delta U_f^i}{\delta t}$$

$$(J_X^i - J_X^0) = C_X^0 \frac{\delta (X)^0}{\delta t}$$

$$(J_X^i - J_X^{i'}) = C_X^i \frac{\delta (X)^i}{\delta t}$$

--Ecuaciones resistivas difusionales

$$J_{XHA} = (1/R_{XHA}^0) (U_f^0 - U_f^2)$$

$$J_X^i = (1/R_X^0) [(X)^i - (X)^0]$$

--Ecuaciones resistivas reactivas

$$J_R^1 = U_f^1 - U_f^0 = k_1 (A)^0 (X)^0 (H)^0 - k_{-1} (XHA)^0$$

$$J_R^2 = U_f^2 - U_f^1 = k_2 (XHA)^i - k_{-2} (A)^i (X)^i (H)^i$$

Los estudios que hemos realizado se efectuaron en estado estacionario, es estas condiciones, todas las derivadas con respecto al tiempo que aparecen en las ecuaciones capacitivas se anulan, de donde se obtiene:

$$(X)^0 + (X)^i + (XHA)^0 + (XHA)^i = \text{CONSTANTE} = (X)_{TOT}$$

que es la ecuación de conservación del acarreador.

El transporte de aminoácidos presenta la cinética de Michaelis-Menten por lo tanto, con el objeto de ver si el modelo conduce a esta ecuación, las relaciones obtenidas de la gráfica se manejaron bajo la hipótesis de equilibrio rápido que se hace en los modelos cinéticos (50, 52). Cabe aclarar, que este procedimiento no introduce elementos artificiales dentro del esquema que estamos manejando pues, como Mikuleky ha señalado (53), la termodinámica de

circuitos unifica las ideas de la cinética y la termodinámica; mas aún, como en seguida veremos, este enfoque nos dará información acerca de los factores que determinan el valor de las constantes cinéticas.

Así, suponiendo que las reacciones representadas por Rr^1 , Rr^2 estan en equilibrio, obtenemos:

$$K_1 = \frac{R_{-1}}{R_1} = \frac{(A)^0 (X)^0 (H)^0}{(XHA)^0} \dots (a)$$



$$K_2 = \frac{R_{-2}}{R_2} = \frac{(XHA)^i}{(A)^i (X)^i (H)^i} \dots (b)$$

De la definición de union-1 y de la condición de estado estacionario, se tiene:

$$J_A^0 = J_X^i = J_{XHA}$$

de las ecuaciones resistivas difusionales:

$$\left(\frac{1}{R_X^0}\right) [(X)^i - (X)^0] = \left(\frac{1}{R_{XHA}^0}\right) (R_{-1} (XHA)^0 - R_2 (XHA)^i)$$

si suponemos que $R_{-1} = R_2$ y definimos:

$$P_1 = R_2 / R_{XHA}^0 \quad \text{y} \quad P_2 = 1 / R_X^0$$

obtenemos:

$$P_2 [(X)^i - (X)^0] = P_1 [(XHA)^0 - (XHA)^i] \dots (c)$$

Finalmente, emplearemos la hipótesis usual de los modelos cinéticos (50):

$$J_A \equiv J_A^{0 \rightarrow i} \propto (XHA)^0$$

Donde $J_A^{0 \rightarrow i}$ es el influjo del aminoácido (en nuestras condiciones experimentales no hay eflujo). Por analogía con los pasos seguidos por Schultz (50), proponemos:

$$J_A = P_1 (XHA)^0 \Leftrightarrow \frac{J_A}{(X)_{TOT}} = \frac{P_1 (XHA)^0}{(X)^0 + (X)^i + (XHA)^0 + (XHA)^i} \dots (d)$$

Donde, como puede verse, se ha ganado información adicional

sobre el modelo cinético de Schultz, por ejemplo tenemos que:

$$P_1 = \frac{k_2}{R_{XHA}^D}$$

Esto es, la constante de velocidad que determina el flujo, es inversamente proporcional a la resistencia difusiva del complejo XHA a través de la membrana, y directamente proporcional a la constante de velocidad de descomposición del complejo en el lado interno de la membrana.

Ahora bien, suponiendo que $K = K_1 = K_2$, de a, b, c y d obtenemos:

$$J_A = \frac{J_{MAX} (A)^0}{K_{ap} + (A)^0} = \left\{ \text{Ec. de Michaelis-Menten} \right\}$$

donde:

$$J_{MAX} = \frac{P_1 (X)_{TOT} (P_2 K + P_1 (A)^i (H)^i)}{P_2 K + 2 P_1 (H)^i (A)^i + K P_1}$$

$$y \quad K_{ap} = \frac{K_M}{(H)^0} = \frac{1}{(H)^0} \left[\frac{K (2 P_2 K + P_1 (A)^i (H)^i)}{P_2 K + 2 P_1 (H)^i (A)^i + K P_1} \right]$$

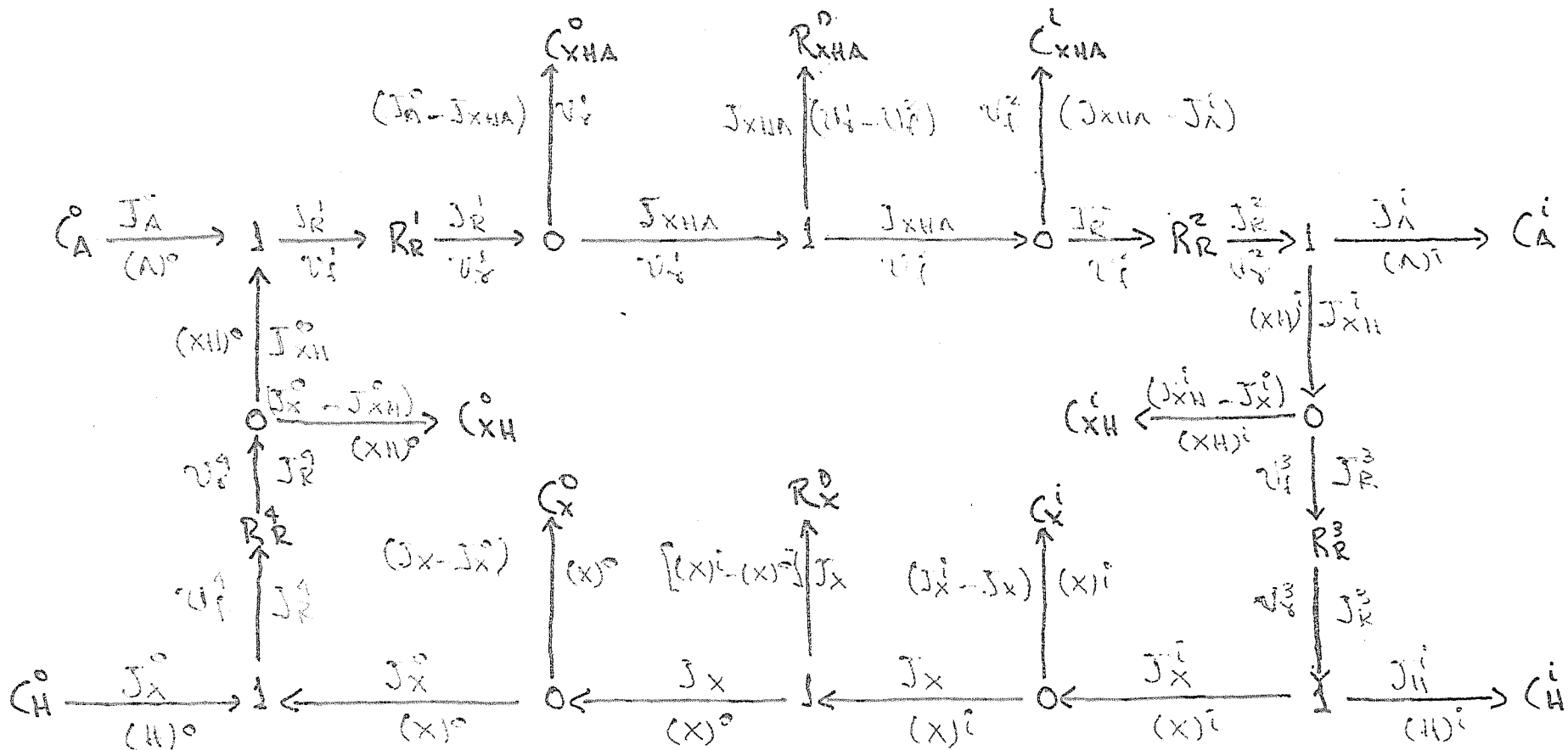
K_{ap} es la constante de Michaelis (K_M) que se mide experimentalmente, como podemos ver, esta es igual a la verdadera K_M dividida por $(H)^0$. Por lo tanto, de acuerdo con el modelo, el cotransporte con proton cinéticamente se manifestará como una disminución en el valor de K_{ap} al disminuir el pH externo.

Para que J_{max} y K_{ap} sean constantes, se debe cumplir que:

- Las resistencias difusionales sean constantes.
- $(A)^i$ sea constante, esta condición se aproxima mediante la corta duración de los ensayos de transporte.

c) $(H)^i$ sea constante, esta condición de acuerdo con Slayman (36) también se satisface en forma aproximada.

2) Consideremos ahora el caso en el que primero se uniera el H^+ con el acarreador y después el aminoácido en el lado externo de la membrana, liberándose en el orden inverso en el interior. La gráfica de union correspondiente es una modificación de la anterior, según se muestra en la siguiente pagina.



Considerando relaciones constitutivas lineales, tenemos:

-Ecuaciones capacitivas

$$(J_A^0 - J_{XHA}) = C_{XHA}^0 \frac{\partial V_f^i}{\partial t}, \quad (J_X^i - J_X) = C_X^i \frac{\partial (X)^i}{\partial t}$$

$$(J_{XHA} - J_A^i) = C_{XHA}^i \frac{\partial V_f^2}{\partial t}, \quad (J_X - J_X^0) = C_X^0 \frac{\partial (X)^0}{\partial t}$$

$$(J_{XH}^i - J_X^i) = C_{XH}^i \frac{\partial (XH)^i}{\partial t}, \quad (J_X^0 - J_{XH}^0) = C_{XH}^0 \frac{\partial (XH)^0}{\partial t}$$

-Ecuaciones resistivas difusionales

$$J_{XHA} = (1/R_{XHA}^D) (V_f^1 - V_f^2)$$

$$J_X = (1/R_X^D) [(X)^i - (X)^0]$$

-Ecuaciones resistivas reactivas

$$J_R^1 = V_f^1 - V_f^2 = R_1 (XH)^0 (A)^0 - R_{-1} (XHA)^0$$

$$J_R^2 = V_f^2 - V_f^3 = R_2 (XHA)^i - R_{-2} (A)^i (XH)^i$$

$$J_R^3 = V_f^3 - V_f^4 = R_3 (XH)^i - R_{-3} (X)^i (H)^i$$

$$J_R^4 = V_f^4 - V_f^5 = R_4 (X)^0 (H)^0 - R_{-4} (XH)^0$$

Bajo las mismas hipótesis que en el modelo anterior, de las relaciones constitutivas, obtenemos nuevamente:

$$J_A = \frac{J_{MAX} (A)^0}{(A)^0 + K_{AP}}$$

donde ahora:

$$J_{MAX} = \frac{P_1 (X)_{TOT} [1 + P_1 R_X^D K^2 (A)^i (H)^i]}{1 + P_1 R_X^D K^2 (A)^i (H)^i + P_1 R_X^D [K^2 (A)^i (H)^i + K (H)^i + 1]}$$

$$K_{AP} = \frac{K}{(H)^0} \frac{[K + (H)^0] [1 + P_1 R_X^D K^2 (A)^i (H)^i] + K^3 (H)^i (A)^i + K^2 (H)^i}{[1 + P_1 R_X^D K^2 (A)^i (H)^i + P_1 R_X^D (K^2 (A)^i (H)^i + K (H)^i + 1)]}$$

3) Finalmente, consideremos que primero se une el aminoácido con el acarreador y después el proton en el lado externo de

la membrana, disociándose primero el proton en el lado interno. La gráfica de union correspondiente es como la anterior, solo que ahora las capacitancias C_{XH}^o y C_{XH}^i deben reemplazarse por C_{XA}^o y C_{XA}^i respectivamente, realizando esta modificación se llega al resultado:

$$J_{MAX} = \frac{P_i (x)_{TOT} (1 + P_i R_x^D K^2 (H)^i (A)^i)}{[(K + (H)^o)/(H)^o] (1 + P_i R_x^D K^2 (H)^i (A)^i) + P_i R_x^D (K^2 (H)^i (A)^i + K(H)^i)}$$

$$K_{AP} = \frac{K}{(H)^o} \left[\frac{2K + K^2 (A)^i + K^3 (H)^i (A)^i + K^3 P_i R_x^D (H)^i (A)^i}{[(K + H^o)/(H)^o] (1 + P_i R_x K^2 (H)^i (A)^i + P_i R_x (1 + K (A)^i + K^2 (H)^i (A)^i)} \right]$$

De los resultados de estos modelos, puede decirse que:

1) Las gráficas de union que hemos realizado son todas correctas, en el sentido de que las relaciones constitutivas que de ellas se obtienen permiten obtener la ecuación de velocidad que sigue el transporte (ec. de Michaelis-Menten).

2) La dependencia funcional que J_{max} y K_{ap} tienen respecto a las constantes cinéticas, es diferente según el orden de unión de los ligandos con el acarreador.

3) Cinéticamente, la participación de los protones en los tres casos considerados afecta al valor de K_{ap} , y sólo que el aminoácido sea el primero en unirse con el acarreador se verá afectado J_{max} . Por consiguiente, la determinación experimental de estos parámetros a distintos valores de pH externo puede, en principio, dar información sobre el orden de formación de los complejos. A este respecto, cabe señalar que el grupo de Slayman (36) propuso un esquema para el

transporte de glicina, en el que se requiere que primero se unan 3 protones al acarreador y después la glicina, el manejo cinético de este modelo, les hizo concluir que el valor de J_{max} depende del pH externo. Este resultado esta en desacuerdo a lo obtenido por nosotros, desafortunadamente en su trabajo Slayman no da los detalles del manejo cinético de su modelo.

4) Este método nos proporciona más información que la obtenida con las consideraciones puramente cinéticas que habitualmente se siguen. Notese a este respecto, que no obtuvimos toda la información que se desprende de las relaciones constitutivas.

5) Lo anterior no significa que las gráficas de union presentadas, sean las más adecuadas para describir un proceso de cotransporte; un mayor acopio de trabajo tanto experimental como sobre las gráficas mismas permitirá obtener un mejor resultado.

Estimulación por K^+ . Gráfica de union.

En este trabajo hemos encontrado que la estimulación del transporte obtenida mediante la preincubación de las levaduras en presencia de K^+ tiene, entre otras, las siguientes características:

1) De acuerdo a lo mostrado en la figura 10, la estimulación tiene un curso temporal largo, que alcanza su máximo en

aproximadamente una hora. Esto contrasta con la velocidad de

entrada del K^+ , el cual es transportado por completo en el orden de minutos (datos obtenidos en nuestro laboratorio). Lo anterior, junto con los datos presentados en las figuras 11 y 13, nos indica que el K^+ no es el causante directo del aumento en el transporte de los aminoácidos, sino que parece inducir la síntesis (con un curso temporal largo) de alguna molécula que es la que directamente produce el aumento en la actividad de las permeasas. Para una justificación más detallada de esta conclusión, vease la discusión al final del trabajo.

2) La preincubación con K^+ , aparta al sistema de la cinética de Michaelis (datos no mostrados).

De esta forma, con el objeto de formular hipótesis sobre el mecanismo mediante el cual las moléculas M sintetizadas al preincubar las levaduras con KCl incrementan la captación de los aminoácidos, se introdujo este elemento a la gráfica de union que no considera el orden de formación del complejo con el acarreador. Se eligió esta gráfica debido a que, en este trabajo, no se estudio la variación de J_{max} y K_{ap} con el pH del medio; por lo tanto no disponemos de datos sobre el orden de formación de los complejos, por lo que se optó por el modelo más general y simple, así la gráfica que no toma en cuenta ningún orden de union para los ligandos se modificó para introducir el efecto del potasio, según se muestra en la siguiente hoja.

El significado de los elementos que constituyen la gráfica, es el mismo que el de los correspondientes a estos en las gráficas anteriores. La diferencia radica únicamente en que, ahora además, se tiene a la molécula M en aquellos elementos donde el símbolo M aparece.

Los elementos nuevos en esta gráfica son:

- La capacitancia C_M , que representa la acumulación en el interior celular de la molécula hipotética M, sintetizada como resultado de preincubar a las levaduras con KCl. El curso temporal largo de la estimulación por K^+ , significa que a C_M debemos asignarle una constante de tiempo grande.
- La resistencia reactiva R_r^3 , que representa la disipación correspondiente a la formación del complejo entre la molécula M y el acarreador X. Este elemento se introdujo ya que, es evidente que, para que la molécula M active al acarreador, primero debe interactuar con este. Se esta considerando además, que la molécula permanece unida al acarreador durante todo el ciclo subsecuente de transporte.
- El transductor TD, este elemento colocado a la salida de C_{Xn}^0 tiene por objeto introducir, en ese lugar, la constante de velocidad k_{-3} , simplemente para consistencia en el manejo de las unidades.

Hechas estas aclaraciones, de los flujos y fuerzas asociados con la gráfica obtenemos:

- Ecuaciones capacitivas

$$(J_A^0 - J_{XHAM}) = C_{XHAM}^0 \frac{\partial U_r^i}{\partial t} ; (J_{XHAM} - J_A^i) = C_{XHAM}^i \frac{\partial U_r^f}{\partial t}$$

$$(J_X^i - J_X^i) = (X^i \frac{\partial (X)^i}{\partial t}) ; (J_X^i - J_{XM}) = (X_M^i \frac{\partial U_Y^3}{\partial t})$$

$$(J_{XM} - (1/R_{-3}) J_{XM}^0) = (X_M^0 \frac{\partial R_{-3}(XM)^0}{\partial t})$$

-Ecuaciones resistivas difusionales

$$J_{XHAM} = (1/R_{XHAM}) (U_Y^1 - U_f^2)$$

$$J_{XM} = (1/R_{XM}) (U_Y^3 - R_{-3}(XM)^0)$$

-Ecuaciones resistivas reactivas

$$J_R^1 = U_f^1 - U_Y^1 = k_1 (A)^0 (H)^0 (XM)^0 - R_{-1} (XHAM)^0$$

$$J_R^2 = U_f^2 - U_Y^2 = k_2 (XHAM)^i - R_{-2} (A)^i (H)^i (M)^i (X)^i$$

$$J_R^3 = U_f^3 - U_Y^3 = k_3 (X)^i (M)^i - R_{-3} (XM)^i$$

Nuevamente, en el estado estacionario, todas las derivadas respecto al tiempo de las ec. capacitivas se anulan, de donde obtenemos la relación de conservación para el acarreador:

$$(X)^i + (XM)^i + (XM)^0 + (XHAM)^0 + (XHAM)^i = \text{CONST} = (K)_{TOT}$$

Si consideramos, al igual que en los modelos anteriores, que el influjo de los aminoácidos esta dado por:

$$J_A = P_1 (XHAM)^0$$

donde ahora:

$(XHAM)^0$ es la concentración del complejo entre el acarreador, el proton, el aminoácido y la molécula M y: $P_1 = k_2 / R_{XHAM}$

entonces, en relación con el manejo de las ecuaciones de la gráfica, se tiene que:

1) Si suponemos que las tres reacciones de formación y descomposición de complejos están en equilibrio, entonces la ecuación de velocidad final tiene la forma de la de Michaelis-Menten. Por lo tanto, dado que al preincubar con el K^+ el sistema ya no sigue esta cinética, podemos concluir que en estas condiciones alguna(s) reacción(es) está(n) fuera del equilibrio.

2) De la relación:

$$J_A = \frac{R_2}{R_{XHAM}^D} (XHAM)^0$$

como una primera y burda hipótesis podemos considerar que la estimulación por el potasio, puede deberse a que:

$$R_{XHAM}^D < R_{XHA}^D$$

esto es, la unión de la molécula M al acarreador provocaría un cambio conformacional en este, tal que la resistencia a la translocación de su sitio activo a través de la membrana disminuiría. Obviamente, a futuro deben de trabajarse las relaciones constitutivas de este y otros modelos alternativos, mediante la asignación de valores a las constantes numéricas, con la ayuda de una computadora, hasta lograr la concordancia con los resultados experimentales, lo que a su vez llevaría al diseño de nuevos experimentos.

DISCUSION

Durante mucho tiempo se ha aceptado que la entrada de aminoácidos en las levaduras ocurre a través de permeasas específicas y de una PG. Las evidencias en que se basó la proposición de este esquema fueron a un tiempo genéticas y cinéticas, donde el punto central del argumento fue la falta de sensibilidad al NH_4^+ de las permeasas específicas, junto con la reaparición de actividad de transporte en mutantes que habían perdido esta capacidad, cuando estos eran crecidos en un medio con prolina en vez de NH_4^+ como fuente de nitrógeno. Lo anterior se explicó como debido a la reactivación de un sistema de transporte no específico, la PG, que mediante experimentos cinéticos de competencia con citrulina, mostró mediar la entrada de aminoácidos básicos y neutros. A estos trabajos es posible hacer las siguientes críticas y observaciones:

1) Nosotros hemos visto que la permeasa de leucina es muy específica por este aminoácido (39), y en este trabajo confirmamos que es inactivada por el NH_4^+ como previamente señaló Kotyk (15). Hemos encontrado así mismo, que la entrada de aspartato no es inactivada por NH_4^+ , pero Grenson reportó que la entrada de glutamato sí lo es, al igual que la de prolina y metionina (20, 21). En resumen, parece que el NH_4^+ puede afectar a un buen número de permeasas de aminoácidos y por consiguiente la reaparición de la actividad de transporte que se observó al reemplazar al NH_4^+

por prolina como fuente de nitrógeno, bien pudo deberse a la desinhibición de algunas de estas permeasas.

2) En ninguno de los trabajos en los que Grenson se apoyó para la formulación de su modelo, se realizaron cinéticas en la cepa silvestre crecida en un medio con prolina, donde se pudiera ver si aparecía un nuevo sistema de transporte, además de cada uno de los específicos que se describieron en las levaduras crecidas en un medio con NH_4^+ . Este punto a mi manera de ver constituye una seria debilidad en la conclusión de Grenson.

3) En todas las cinéticas reportadas, nunca se consideró un intervalo amplio de concentraciones (no se pasó de 0.20 mM).

4) A partir de la formulación del modelo en 1970, este ha sido generalmente aceptado y los datos que se han obtenido en diversos estudios de transporte de aminoácidos, simplemente se han tratado de explicar dentro del contexto propuesto por Grenson. Pero, resulta muy curioso que no ha habido ningún trabajo donde se describan las propiedades de la PG, como se ha hecho por ejemplo con las permeasas de prolina y leucina.

En particular, con los datos presentados en este trabajo podemos decir lo siguiente a cerca de la PG :

1) La citrulina parece entrar por dos sistemas de transporte y no solamente por uno, como se había dicho, identificado como la PG. El componente de alta afinidad presenta la especificidad que se esperaría de un transportador de aminoácidos básicos. No obstante, hay que señalar que la prueba definitiva a favor de dos sistemas en vez de uno con

dos sitios de unión, solo puede darse con mutantes que no presenten uno de los dos supuestos sistemas.

2) La leucina entra por una sola permeasa y esta no es utilizada por la citrulina, ello resulta extraño si se recuerda que se supone que los aminoácidos neutros pueden entrar por la PG.

En conclusión, podemos decir que en nuestras levaduras, o no existe la PG, o bien los aminoácidos neutros no pueden entrar por ella, además de que la entrada de citrulina ocurre al menos a través de dos componentes.

Desafortunadamente en este momento no podemos proponer un modelo para la entrada de aminoácidos a las levaduras, dado que no nos fue posible realizar cinéticas de competencia a través del componente de alta afinidad por citrulina, por lo que solo podemos decir que este componente muestra la especificidad que es de esperarse de un acarreador de aminoácidos básicos. Por otro lado, hemos encontrado que, las características cinéticas del transporte de aminoácidos, son función del estado metabólico de las levaduras (datos no mostrados); por lo que no debe pensarse en términos de modelos cinéticos rígidos, sino más bien en esquemas sujetos a mecanismos regulatorios de diversa índole; en este sentido, el modelo de Grenson es probablemente uno de los posibles mecanismos de las levaduras para adaptarse a su medio ambiente, el cual no se presenta en nuestras condiciones de trabajo.

Por lo que toca a los efectos del NH_4^+ y del K^+ , los

resultados presentados en este trabajo indican:

1) La estimulación por K^+ , parece ser una característica común del transporte de aminoácidos en las levaduras, a diferencia de la inhibición por NH_4^+ , la cual no opera sobre ciertas permeasas como la del aspartato (fig.6). Este punto podría inducirnos a pensar que ambos efectos son independientes, es decir, que no tienen elementos de interacción en su mecanismo, sin embargo :

2) De acuerdo con los datos presentados en la fig.7 y con resultados no mostrados, podemos afirmar que la preincubación de las levaduras en presencia de K^+ las protege contra la inhibición del NH_4^+ . Esto no se puede explicar, a menos que se admita que ambos efectos deben tener algún(os) aspecto(s) común(es). Lo anterior también explica el que al preincubar a las levaduras en presencia de cantidades equimolares de K^+ y NH_4^+ , los efectos que estas iones producen de manera individual se cancelan mutuamente (fig.8).

3) Aunque la estimulación por K^+ es un fenómeno general dentro del transporte de aminoácidos, este tiene características propias en los distintos acarreadores, como lo demuestra el curso temporal mostrado en la Fig.10, y el hecho de que tanto para la citrulina como para el aspartato exista un componente de activación en este efecto, en tanto que dicho componente no existe o es más difícil de detectar (menos importante) para la permeasa de leucina (fig.12).

Los datos de las figuras 10, 11 y observaciones hechas en nuestro laboratorio muestran que, la estimulación del K^+ en

el transporte, a) requiere que las células sean capaces de sintetizar proteínas y, b) tiene un curso temporal lento comparado con la velocidad de entrada del K^+ a las células, que es del orden de minutos. Además como se muestra en la figura 13, el K^+ no tiene efecto alguno ni sobre la velocidad ni sobre los valores finales (a una hora) alcanzados en la síntesis general de proteínas. Estas observaciones hacen difícil explicar el aumento en la captación de aminoácidos mediante un incremento en la cantidad de permeasas ocasionado directamente por el K^+ ; lo que mas bien creemos que ocurre, es que el K^+ provoca en específico la síntesis (con un curso temporal largo) de alguna molécula que aumenta la actividad de las permeasas. La introducción de este elemento a la gráfica de unión correspondiente, nos permitirá, en el futuro, realizar hipótesis sobre el mecanismo de estimulación producido por el potasio, esto a través de la asignación de valores a las constantes cinéticas y su simulación con computadora.

Los resultados presentados en la fig.14, muestran que al menos por lo que toca a la citrulina, la preincubación de las levaduras a pH 8.5 también produce un efecto estimulador comparable al del K^+ . La preincubación a pH alto, produce un aumento del pH interno de las células (54) que podría, en este caso ser la señal que desencadena la estimulación del transporte. Por otro lado, en estas condiciones (pH 8.5), el K^+ estimula aún más la captación de aminoácidos (datos no mostrados) sin producir una alcalinización neta extra del

interior celular, pero sí una aceleración del proceso de aumento del pH interno (10, 54). Por lo tanto, en relación a este punto, podemos concluir que la estimulación ejercida por el K⁺ se puede llevar a cabo a través de un aumento en el pH interno, solo si el aspecto determinante de este proceso es la cinética del cambio y no el valor final del pH interno.

Otra posibilidad, es que la depolarización producida por la entrada de K⁺ abra canales de Ca²⁺, siendo el aumento en la concentración interna de este ion la señal que aumentaría el transporte de aminoácidos, en este sentido, cabe señalar que se han encontrado canales de K⁺ en las levaduras (55), por lo que es probable que también presenten canales de Ca²⁺; por otro lado, aunque en nuestros medios no agregamos calcio, este catión se encuentra siempre como contaminante de los reactivos, así, por flamometría, encontramos en el medio A + 10 mM KCl una concentración de Ca²⁺ de 5 uM y si a este medio se le agregan levaduras, a la densidad usual, a los 2 min la concentración de Ca²⁺ es de 11 uM, probablemente por liberación del Ca²⁺ pegado a la pared y a la membrana plasmática, y/o a la liberación de Ca²⁺ intracelular; por lo tanto, si se abrieran canales de calcio este entraría a las células (considerando un $\Delta\psi$ negativo y una concentración interna de calcio libre de aprox 0.1 uM); este posible efecto de K⁺, a través del potencial de membrana, explicaría su inespecificidad (fig 9).

En resumen, podemos decir que las levaduras hacen uso de una serie de señales diferentes para aumentar su transporte de

aminoácidos y otros nutrientes (ver Kotyk, ref 15). Todas las señales producen el mismo resultado, pero, cada una mediante un mecanismo diferente, lo que puede resultar en una mayor capacidad de adaptación a medios ambientes cambiantes.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Harold, F.M. (1982) in *Electrogenic Ion Pumps* (Slayman, C.L. Ed) pp.45 Academic Press, New York.
- 2.- Gunn, B.R. (1980) *Ann. Rev. Biochem.* 42: 249-259.
- 3.- Caplan, S.R. and Essig, A. (1983) *Bioenergetics and Linear Nonequilibrium Thermodynamics*, Harvard University Press, Cambridge.
- 4.- Oster, F.G., Perelson, S.A. and Katchalsky, A. (1973) *Quart. Rev. Biophys.* 6:1-134.
- 5.- Oster, F.G., Perelson, S.A. and Katchalsky, A. (1971) *Nature.* 234: 393-399.
- 6.- Eddy, A.A. (1981) *Sci. Prog. Oxf.* 67: 245-270.
- 7.- Eddy, A.A. (1978) *Curr. Topics in Membranes and Transport.* 10: 279-360.
- 8.- Wilson, B.D. (1978) *Ann. Rev. Biochem.* 47: 933-965.
- 9.- Peña, A. (1981) in *Proceedings of the Vth International Symposium on Yeast*. pp: 305-309, Pergamon Press.
- 10.- Peña, A. (1976) in *Mitochondria* (Packer, L. and Gómez-Poyou, A. Eds.) pp: 21-30, Academic Press, New York.
- 11.- Peña, A. (1973) *FEBS Letters.* 34: 117-119.
- 12.- Peña, A. and Ramírez, G. (1975) *Arch. Biochim. Biophys.* 22: 369-384.
- 13.- Peña, A. (1975) *Arch. Biochim. Biophys.* 167: 397-409.
- 14.- Goffeau, A. and Slayman, W.C. (1981) *Biochim. Biophys. Acta.* 693: 197-223.
- 15.- Kotyk, A., Horák, J. and Knotková, A. (1982) *Biochim.*

- Biophys. Acta. 698: 243-251.
- 16.- Sigler, K., Knotková, A. and Kotyk, A. (1981) Biochim. Biophys. Acta. 643: 572-582.
- 17.- De la Peña, P., Barros, F., Gascon, S. and Lazo, P.S. (1982) Eur. J. Biochem. 123: 447-453.
- 18.- Grenson, M., Mousset, M., Wiame, M.J. and Bechet, J. (1966) Biochim. Biophys. Acta. 127: 325-338.
- 19.- Grenson, M. (1966) Biochim. Biophys. Acta. 127: 339-346.
- 20.- Gitz, J.J. and Grenson, M. (1966) Biochim. Biophys. Acta 135: 507-516.
- 21.- Grenson, M., Hou, C. and Crabeel, M. (1970) Biochim. Biophys. Acta. 103: 770-777.
- 22.- Rose, H.A. and Harrison, S.J. (1971) The Yeast. II. Academic Press. London.
- 23.- Dubois, E. and Grenson, M. (1979) Molec. Gen. Genet. 175: 67-76.
- 24.- Peña, A. y Ramírez, J. (1985) en IV. Congreso de Bioenergética y Biomembranas. pp: 85. Sociedad Mexicana de Bioquímica. Tlaxala, Tlax. México.
- 25.- Grenson, M. (1983) Eur. J. Biochem. 133: 135-139.
- 26.- Grenson, M. (1983) Eur. J. Biochem. 133: 140-144.
- 27.- Horák, J. and Rihová, L. (1982) Biochim. Biophys. Acta. 691: 144-150.
- 28.- Ramos, E.H., De Bongioanni, L.C., Cuesta Casado, M.C. and Stoppani, A.O.M. (1977) Biochim. Biophys. Acta. 467: 220-237.
- 29.- Poole, S.P., Franklin, M., Glenn, R.A. and Dilworth, J.M. (1985) J. Gen. Microbiol. 131: 1441-1448.
- 30.- Eddy, A.A., Backen, K. and Watson, G. (1970) Biochem.

J. 120: 835-858.

31.- Seaston,A.,Inkson,C.and Eddy,A.A. (1973) Biochem. J. 134: 1031-1043.

32.- Eddy,A.A.and Nowaki,J.A. (1971) Biochem. J. 122: 701-711.

33.- Seaston,A.,Carr,G.and Eddy,A.A. (1976) Biochem. J. 154: 669-676.

34.- Cockburn,M.,Ernshaw,P.and Eddy,A.A. (1975) Biochem. J. 146: 705-712.

35.- Eddy,A.A.,Indge,K.J.,Backen,K.and Nowaki,J.A. (1970) Biochem.J. 120: 845-852.

36.- Ballarin,A.,Den Hollander,A.J.,Sanders,D.,Slayman ,W.C. and Slayman,L.C. (1984) Biochim. Biophys. Acta. 778: 1-16.

37.- Ohsumi,Y.and Anraku,Y. (1981) J. Biol. Chem. 256: 2079-2082.

38.- Kotyk,A.,Rihová,L.and Ponec,M. (1970) Fol. Microbiol. 16: 451-453.

39.- Gómez,F. (1984) Tesis de Licenciatura. Fac. Ciencias. UNAM. México.

40.- Horák,J.,Rihová,L.and Kotyk,A. (1981) Biochim. Biophys. Acta. 649: 436-440.

41.- Kotyk,A.and Rihová,L. (1972) Fol. Microbiol. 17: 353-356.

42.- Knotková,A.and Kotyk,A. (1981) Fol. Microbiol. 26: 377-381.

43.- Ramírez,J. y Peña,A. (1986) Biochim.Biophys.Acta. 855, 129.

- 44.- Ramos,E.H.,De Bongioanni,C.L.and Stoppani,A.O.M.
(1980) Biochim. Biophys. Acta. 599: 214-231.
- 45.- Ramos,E.H.,De Bongioanni,C.L.,Claisee,M.L. and
Stoppani,A.O.M. (1975) Biochim. Biophys. Acta. 394: 470-
481.
- 46.- Kotlyar,N.and Ramos,E.H. (1983) Biochim. Biophys. Acta.
734: 378-380.
- 47.- Peña,A.,Piña,M.,Escamilla,E.and Piña,E. (1977) FEBS.
Letters. 80: 209-213.
- 48.- De Kloet,S.,Van Wermerskerken,R.and Konins Berger,V.
(1961) Biochim. Biophys. Acta. 47: 138-143.
- 49.- Fricke,V. (1975) Anal Biochem. 63: 555-558.
- 50.- Schultz,G.S. (1980) Principles of Membrane Transport,
Cambridge University Press.
- 51.- Serrano,R. (1985) Plasma Membrane ATPase of Plants and
Fungi, CRC Press,Inc.
- 52.- Segel,H.I. (1975) Enzyme Kinetics, John Wiley and Sons,
New York.
- 53.- Mickulecky, D.C (1983) in Biological Structures and
Coupled Flows (Oplatka, A. and Balaban, M. Eds) Academic
Press, New York.
- 54.- Peña, A., Cinco,G., Gómez-Poyou,A. y Tuena,M. (1972).
Arch.Biochim.Biophys. 153: 413-425.
- 55.- Gustin,C.M. et.al. (1986) Science. 233: 1195-1197.