

03081
19
2ej



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

**UNIDAD ACADEMICA DE LOS CICLOS PROFESIONALES Y DE
POSGRADO DEL C.C.H.**

**REGULACION DE LA ACTIVIDAD DE LA PERMEASA
GENERAL DE LOS AMINOACIDOS (GAP1) DE LAS
LEVADURAS POR EL POTASIO**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

DOCTORA EN INVESTIGACION

BIOMEDICA BASICA

P R E S E N T A:

M. EN IBB GISELE OLIVIA ROSAS SOLARES

INSTITUTO DE FISILOGIA CELULAR

MEXICO, 1995

FALLA DE ORIGEN

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México

UNAM



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 está 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.

*A mi abuelita **Leonor**, mamá **Nonón**, por ser el cimiento de una familia tan increíble, por su presencia callada y sin embargo, tan imprescindible, por su temple y madera, por estar tan cerca de nosotros brindando tanto cariño, mi respeto y todo mi amor.*

*A mis papás **Olga** y **Beto**, pasan los años, aumenta el conocimiento de la vida, nos relacionamos con personas maravillosas, aprendemos a respetar, apreciar y amar la vida que invaluablemente nos dieron. Y con todo y lo que hemos aprendido y admirado, siguen siendo los mejores.*

*A mis hermanos **Javier**, **Héctor**, **Oscar** y **Vanessa**. Cuántas veces me he preguntado lo que sería mi vida sin su presencia, su cariño, su tenacidad y la herencia más maravillosa que nos han dado, la solidaridad y el gran amor que hemos compartido desde siempre.*

*A **Erick**, sin importar en donde estemos, siempre estas aquí, con tu manera de ser tan hermosa y tu cariño incondicional.*

*A mis niños preciosos **Betito**, **Nancy** y **Gustavo**, que con sus mutuos celos me hacen sentir la mujer más amada de esta tierra: afortunadamente los seres humanos poseemos un inmenso corazón que compartir.*

*A mis cuñadas **Chabe** y **Ale**, que son parte fundamental de la familia, en realidad dos hermanas más, por ser tan buena onda y continuar sembrando rosas en este bello jardín.*

*A todos mis tíos y tías, primos y primas. todos tan diferentes y sin embargo seguimos juntos, apoyándonos en las tristezas y alegrías. A **Ericka** por estar siempre tan cercana.*

*A **Emilita**, **Elena**, **Minerva**, **Paty** y **Haydeé**. ¿Cómo podría vivir sin ustedes? y ¡cómo hemos aprendido de nuestras locuras!*

*Al **Dr. Peña**, por el aprendizaje y el apoyo constante durante todos estos años. Mi agradecimiento más profundo y mi admiración porque ante todo posee una invaluable calidad humana.*

*A mis bellos amigos de la Universidad **Martita, Norma, Emanuel, Carlos, Nallely, Ruth, Carmen, Lourdes, Domi y Esperanza**. Por todo lo que hemos compartido y por la amistad que me brindaron.*

*A mis amigos de la facultad **Chelo, el brody y Alfredo** y mis amigas de la prepa **Dalila y Telle**.*

*A **Don Luis Ibáñez**, con quien he saboreado tan exquisitas conversaciones y a la **Sra. Ma. Elena Rodríguez** por ser tan cariñosa conmigo.*

*A los chicos del **pedregal** que son tan buenos amigos.*

*A la **Dra. M. Tuena**, al **Dr. Gómez-Puyou** y a mi amiga **Miriam Altamirano**, mi admiración por mostrarme el camino.*

A los miembros del comité sinodal, por sus sugerencias y comentarios al revisar este trabajo.

*Durante mi estancia en este Instituto, muchas personas han influido en la visión que ahora tengo de la actividad científica. Por sus sugerencias, consejos, ideas e incluso ayuda experimental, mi agradecimiento más sincero, especialmente a la amiga **Claudia**.*

***Escucha el canto del Fénix
en la cima de la Colina,
Entre los bosques de Dyandra
Abiertos al Sol Levante.
Tupidas las hojas,
Calmo y Sereno el Canto***

***Kung-Fu-Tzé
(Confucio)***

RESUMEN

Se estudió el efecto del potasio en el sistema de transporte general de los aminoácidos GAP1 de las levaduras *Saccharomyces cerevisiae*. En las levaduras incubadas en presencia de glucosa y potasio, se observó una acumulación importante del catión. En estas condiciones, las células aumentaron su capacidad de transportar a los aminoácidos después de un periodo de 30 a 60 minutos de incubación, este aumento fue mayor que el de las células que se preincubaron sólo con glucosa. Existe una correlación entre el incremento en la actividad del transporte de los aminoácidos y la concentración del potasio en el interior de las levaduras. La preincubación en presencia del potasio impidió la inactivación de las permeasas que se produce por los iones amonio. La citrulina es transportada exclusivamente por la permeasa GAP1; la captación de este aminoácido, también se incrementó cuando las levaduras se preincubaron en presencia de potasio. Esta activación por el potasio no se observó cuando la síntesis de proteínas se interrumpió por la adición de la cicloheximida. Esto indica que el potasio es capaz de iniciar la síntesis *de novo* adicional de la GAP1, y por lo tanto aumentar su capacidad de transporte. Esta conclusión se fundamentó con el análisis del contenido de RNA mensajero de la GAP1, en levaduras que se preincubaron en presencia y/o ausencia de potasio, de amonio (que inhibe la transcripción del mensajero), o de ambos. En experimentos realizados con una mutante de *Saccharomyces cerevisiae*, que carece de la proteína Npr1 (que reactiva a la GAP1), el potasio no fue capaz de aumentar la captación de los aminoácidos como lo hizo en las levaduras silvestres. Lo anterior sugiere que el potasio podría tener un doble efecto: iniciar una síntesis adicional de la permeasa GAP1 e interactuar con el producto del gene NPR1 para aumentar la actividad de la permeasa ya presente.

SUMMARY

The effect of potassium on amino acid transport was studied in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Starved yeast cells accumulated potassium when the cation plus glucose were present in the incubation medium. Under these conditions, a several fold increase in amino acid transport activity, as compared with cells incubated only with glucose, was developed within 30 to 60 minutes of incubation. There was a distinct correlation between the increase of the amino acid transport activity and the internal potassium concentration. Preincubation in the presence of potassium also prevented the inactivation of amino acid permeases by ammonium. Citrulline is taken up exclusively by the GAP1 permease. Its uptake was also increased in potassium preincubated cells. This activating effect by potassium was not observed when protein synthesis was blocked by cycloheximide. This indicates that potassium elicited an additional *de novo* synthesis of GAP1 thus increasing the transport capacity of yeast. This conclusion was further supported by analysis of the GAP1 mRNA contents of cells preincubated with and without potassium, ammonium (which repress messenger transcription), or both. Analogous experiments with a *Saccharomyces cerevisiae* mutant deficient in NPR1 (the protein that reactivates the GAP1 permease) revealed that potassium was unable to increase amino acid uptake to the rates reached by the wild-type strain. This suggested that potassium exhibits a dual effect: it initiates an additional protein synthesis of the GAP1 permease and it interacts with NPR1 product to increase the activity of the existing permease in the plasma membrane. The results are discussed using the relevant literature as a background to analyse the regulatory effect of potassium on the activity of the general amino acid permease.

LISTA DE ABREVIATURAS

CCCP	Carbonil metacloro cianuro fenil hidrazona
DCCD	Diciclohexil carbodiimida
DECP	Dietil pirocarbonato
DNP	2,4-dinitrofenol
EtBr	Bromuro de etidio
EDTA	Acido etilen diamino tetraacético
GABA	Acido gamma amino butírico
$\Delta\mu_{H^+}$	Potencial electroquímico de protones
MES	Acido morfolino etanosufónico
MOPS	Acido morfolino propanosulfónico
NCI	Mecanismo de la Inactivación Catabólica Nitrogenada
NCR	Mecanismo de la Represión Catabólica Nitrogenada
TCA	Acido tricloroacético
TEA	Trietanolamina
TRIS	Tris-hidroximetil amino metano
tRNA	RNA de transferencia
UAS	Secuencias de activación de la transcripción

GENES RELACIONADOS EN LA REGULACION POR EL NITROGENO

- GAP1** Gene estructural que codifica para la Permeasa General de los Aminoácidos de las levaduras *Saccharomyces cerevisiae*.
- GLN3** Gene que codifica para el activador de la transcripción de los genes regulados por el nitrógeno.
- MEP1, MEP2** Genes que codifican para los sistemas de transporte de alta y baja afinidad del amonio.
- NPI1, NPI2** Genes que codifican para las proteínas inactivadoras del mecanismo de inactivación-reactivación de las permeasas reguladas por el nitrógeno.
- NPR1** Gene que codifica para la proteína reactivadora del mecanismo de inactivación-reactivación de las permeasas reguladas por el nitrógeno.
- PUT4** Gene estructural que codifica para la permeasa de L-prolina
- UEP1 /DAL5** Gene de la permeasa de ureidosuccinato-alantoato.
- UGA4** Gene de la permeasa del ácido gamma amino butírico.
- URE2/GDHCR** Represor catabólico de la glutamato deshidrogenasa. Se ha propuesto como el represor general de la síntesis de las enzimas y proteínas sujetas a la represión catabólica nitrogenada.

CONTENIDO

I	INTRODUCCION	1
1.	Compuestos nitrogenados utilizados como fuentes de nitrógeno o como precursores biosintéticos	1
2.	Requerimientos energéticos del transporte de los aminoácidos y la síntesis de proteínas	2
3.	Sistemas de transporte de aminoácidos en las levaduras	4
4.	La Permeasa General de los Aminoácidos (GAP1)	6
5.	Regulación del transporte de los aminoácidos. Mecanismo de la Represión Catabólica Nitrogenada (NCR)	8
5.1	Permeasas sensibles a la NCR	8
5.2	Inactivación catabólica nitrogenada (NCI) y Represión catabólica nitrogenada (NCR): Mecanismos de regulación de los sistemas de captación de compuestos nitrogenados	9
5.2.1	Inactivación Catabólica Nitrogenada (NCI)	9
	A) Control Negativo	9
	B) Control Positivo	10
5.2.2	Regulación de la actividad de la Permeasa General de los Aminoácidos (GAP1)	11
5.2.3	Represión Catabólica Nitrogenada (NCR)	12
6.	Algunos aspectos del transporte del potasio y el amonio en las levaduras	13
6.1	Transporte del Potasio	13
6.2	Transporte del Amonio	14
6.3	Efectos del potasio en el transporte de los aminoácidos y relaciones entre los efectos del potasio y el amonio	15
II	OBJETIVOS	19
III	MATERIALES Y METODOS	20
1.	Cepas y plásmidos	20
2.	Cultivo de las levaduras	21

3.	Ensayo de captación de los aminoácidos y de la metilamina	22
4.	Incorporación de los aminoácidos a la síntesis de proteínas totales	22
5.	Obtención de plásmidos y sondas	23
5.1	Maxipreparación del DNA de los plásmidos	23
5.2	Digestión con enzimas de restricción	24
5.3	Purificación de las sondas de DNA	24
5.4	Marcaje de las sondas por "Marcado al azar"	24
6.	Replicas tipo Northern	25
6.1	Minipreparación de RNA total de las levaduras	25
6.2	Electroforesis del RNA	26
6.3	Transferencia a membranas de nylon	26
6.4	Hibridación	27
6.5	Exposición de autorradiografía	27
IV	RESULTADOS	28
1.	Efectos del potasio en el transporte de la L-citrulina	28
1.1	Efectos de la concentración de potasio en la captación de la citrulina	28
1.2	Curso temporal de la estimulación del transporte de la citrulina	29
1.3	Inhibición del transporte y de la síntesis de proteínas	32
1.4	Características cinéticas del transporte de la citrulina	34
1.5	Efecto del amonio en el transporte de la citrulina	35
1.6	Transporte en las mutantes del mecanismo de inactivación reactivación (NCI) de la GAP1	36
2.	Cinética de competencia Metilamina / Potasio	38
3.	Efecto del Potasio en la transcripción del RNA mensajero de la Permeasa General de los Aminoácidos (GAP1)	41
V	DISCUSION	45
VI	CONCLUSIONES	56
VII	PERSPECTIVAS	57
XIII	REFERENCIAS	59

I. INTRODUCCION

1. COMPUESTOS NITROGENADOS UTILIZADOS COMO FUENTES DE NITROGENO O COMO PRECURSORES BIOSINTETICOS

El nitrógeno es un elemento esencial que se encuentra en muchos compuestos simples y macromoléculas de las células; debido a ésto, no es sorprendente que una gran proporción de la actividad celular esté concentrada en la captación y en la asimilación del nitrógeno.

Las levaduras son capaces de utilizar una gran variedad de compuestos nitrogenados que se encuentran en el medio ambiente. Estos organismos transportan dos clases de compuestos nitrogenados: un grupo que se utiliza como fuente de nitrógeno y es catabolizado durante su captación por las células; y el otro grupo que se utiliza como precursor o intermediario biosintético y que es directamente incorporado en las macromoléculas sin ser catabolizado. La glutamina es el principal donador de nitrógeno para muchos microorganismos procariontes y eucariontes; si se encuentra presente (o de manera equivalente el glutámico y el amonio), se utiliza como fuente de nitrógeno preferente. En condiciones en que estas fuentes de nitrógeno primarias están limitadas o ausentes, los organismos pueden expresar diversos genes cuyos productos les permiten utilizar diversas fuentes de nitrógeno secundarias como los aminoácidos [1-3].

La utilización de los aminoácidos como fuentes de nitrógeno primarias o secundarias, o como componentes de las proteínas, requiere de su transporte al interior de las células, seguido de alfa-desaminación o transaminación, o de la incorporación directa del aminoácido [4] (Figura 1).

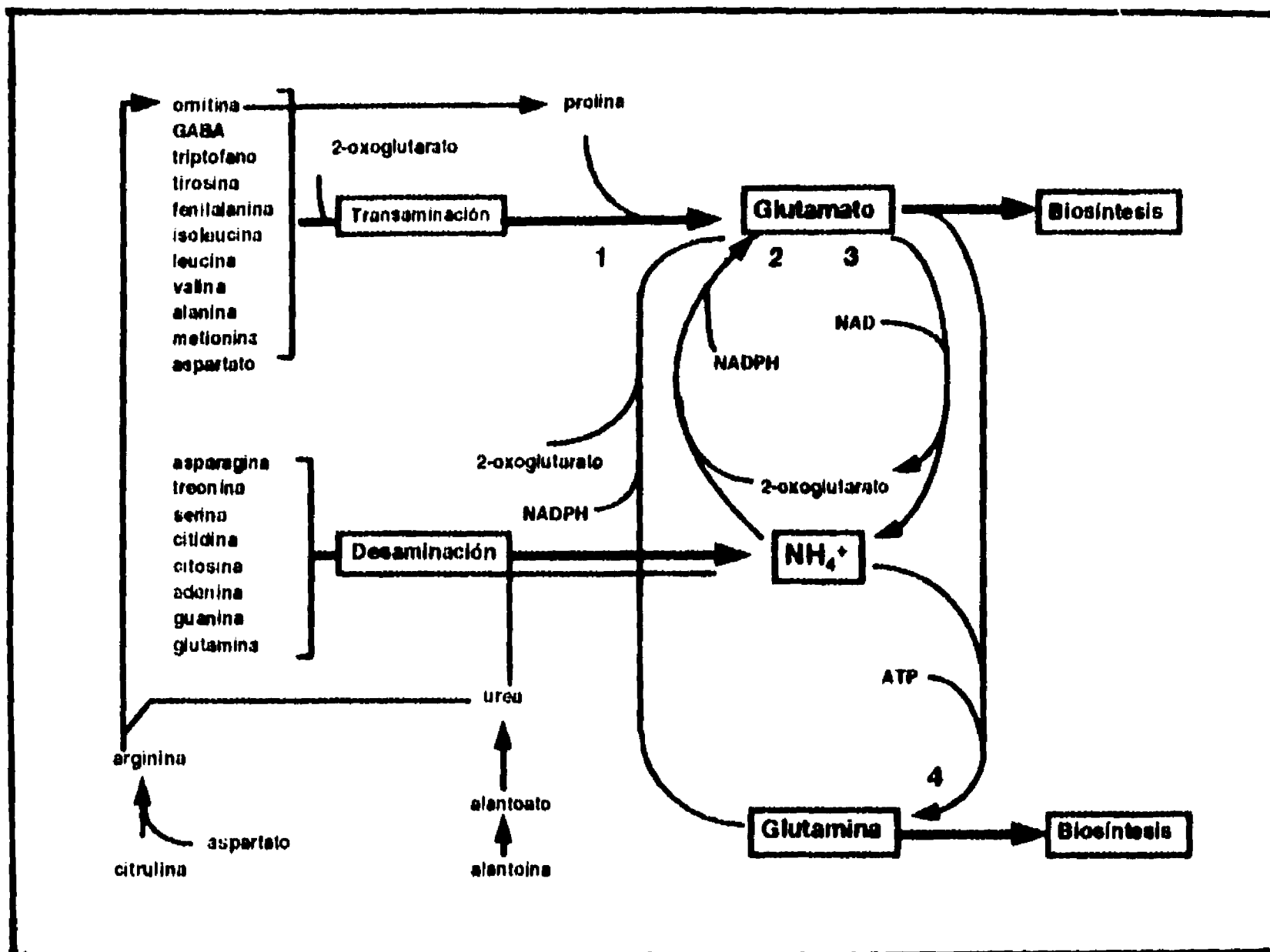


FIGURA 1. Aminoácidos implicados en la asimilación del nitrógeno en *Saccharomyces cerevisiae*. (1) glutamato sintasa; (2) glutamato deshidrogenasa anabólica; (3) glutamato deshidrogenasa catabólica; (4) glutamino sintetasa. Modificado de Grenson, 1992 [20].

2. REQUERIMIENTOS ENERGETICOS DEL TRANSPORTE DE AMINOACIDOS Y LA SINTESIS DE LAS PROTEINAS

Peter Mitchell en 1961 [5], postuló que la diferencia del potencial electroquímico de los protones ($\Delta\tilde{\mu}_{H^+}$), generada por la ATPasa de H^+ , era la fuente inmediata de energía que se requería para energizar los sistemas de transporte activo en los microorganismos eucariontes. La membrana plasmática de las levaduras posee una ATPasa de protones; esta enzima bombea protones al exterior por la hidrólisis

del ATP y genera una diferencia en el potencial electroquímico de los H^+ que es aprovechado por los diferentes sistemas de transporte activo [6].

Los aminoácidos son transportados a través de la membrana plasmática de las levaduras en acoplamiento con el flujo de protones [7]. Los flujos de los iones y los gradientes que de ellos resultan, se realizan por acarreadores diferentes [8-10] (Figura 2). Estos flujos dependen finalmente del funcionamiento de la ATPasa de protones de la membrana. En condiciones en la que ésta no funciona, por ejemplo, cuando la producción de ATP se inhibe por la adición de inhibidores como la dicitclohexil carbodiimida (DCCD) o de desoxiglucosa [11], los aminoácidos se transportan por los gradientes combinados de los protones (en cotransporte con los aminoácidos) y del potasio que se mueve en la dirección opuesta [12,13]. Cuando hay una ATPasa funcional en las levaduras, ésta y los sistemas de transporte del potasio, restituyen los gradientes de ambos iones; es decir, los protones que son cotransportados con el aminoácido son rápidamente expulsados al exterior de la célula a través de la bomba de protones [14].

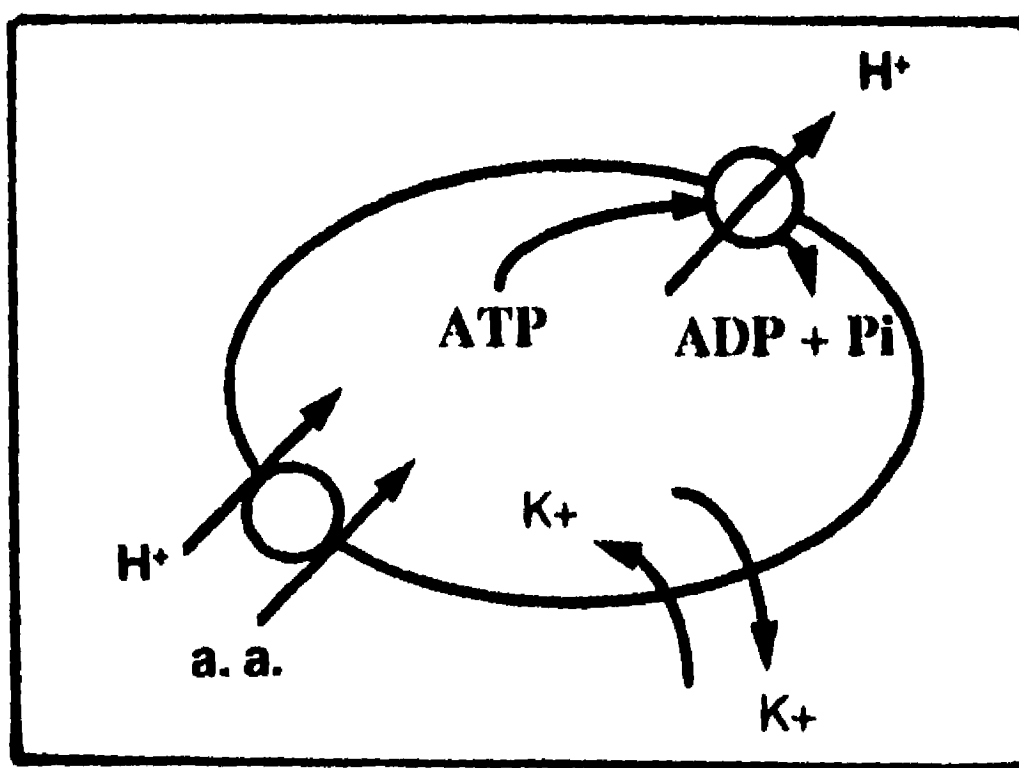


FIGURA 2. Mecanismo del transporte de los aminoácidos en las levaduras. El cotransporte de los aminoácidos con los H^+ es energizado por la diferencia en el gradiente de los protones ($\Delta\tilde{\mu}_{H^+}$) generado por la H^+ -ATPasa de la membrana plasmática de las levaduras.

Cuando las células de levadura se ayunan desaparecen muchos de los sistemas de transporte, entre ellos los de los aminoácidos. El transporte de diversos sustratos requiere de la presencia de una fuente de energía metabólica. La incubación de las células en presencia de un sustrato fermentable (como la glucosa) o respiratorio (como el etanol) desencadena la síntesis de los sistemas de transporte. En *Saccharomyces cerevisiae* la captación de los aminoácidos aumenta después de preincubar a las levaduras en presencia de glucosa o de otras fuentes de carbono [15-17]. La glucosa desempeña dos funciones paralelas: constituye una fuente de energía inmediata para las células (que activa a la ATPasa de H⁺ y genera un gradiente electroquímico de H⁺) y proporciona una señal para iniciar la síntesis de diversos sistemas de transporte [16-19].

3. LOS SISTEMAS DE TRANSPORTE DE AMINOACIDOS EN LAS LEVADURAS

Una gran cantidad de transportadores de aminoácidos se ha detectado por el aislamiento de mutantes en las que se inactiva selectivamente a una permeasa sin alterar las actividades enzimáticas relacionadas con el metabolismo del aminoácido correspondiente. La existencia de estas permeasas se ha comprobado mediante el estudio de sus características cinéticas, su comportamiento, y mediante la inhibición competitiva del sistema transportador [1,4].

Las levaduras poseen dos tipos de sistemas de transporte para los aminoácidos: unos que son específicos para uno de ellos o para un tipo de aminoácidos estructuralmente relacionados, y otros generales, compartidos por diversos tipos de aminoácidos [4,20] (Tabla 1).

Los sistemas específicos se pueden estudiar y diferenciar mediante mutantes deficientes en el transporte, en los cuales la captación del aminoácido disminuye en relación con las levaduras silvestres. En diversos estudios se ha demostrado la presencia de más de un sistema de transporte para un aminoácido o un grupo de ellos relacionados estructuralmente por sus características cinéticas y su especificidad.

TABLA 1. Sistemas de transporte de los aminoácidos en *Saccharomyces cerevisiae*

----- Sistemas Constitutivos -----				
	Sistema	Aminoácido	Kt (μ M)	Jmax nmol/min/mg prot.
Aminoácidos Básicos	I	L-arginina	10	23
		L-lisina	170-200	17
	II	L-lisina	25	8
	III	L-histidina	20	11
	IV	L-histidina	500	28
Aminoácidos Neutros	V	L-metionina	12	13
	VI	L-metionina	770	13
	VII	L-leucina	84	1*
	VIII	L-leucina	1400	2*
Aminoácidos Acídicos y sus derivados	IX	L-asparagina	350	33*
	X	L-glutamina	400	-
	XI	L-glutamina	-	-
	XII	L-glutámico	30	40
----- Sistemas regulados por la fuente de N -----				
Permeasa General de los Aminoácidos GAP1	XIII	L-citrulina	80	-
		L-arginina	7.6	-
		L-lisina	3.1	-
		L-ornitina	4	-
		L-triptofano	9-13	-
		L-glutámico	1000	20*
		D-histidina	25	16
		D-serina	500	-
Permeasa de Prolina PUT4	XIV	L-prolina	31	40*
Permeasa de Glutamato	XV	L-glutámico	112	-
Permeasa de Serina	XVI	L-serina	250	-

* Los valores de Jmax se expresan en nmolas/min/mg de peso seco. Modificado de Horák, 1986 [4].

De esta manera se han descrito sistemas de transporte específicos para aminoácidos básicos [21,22], neutros [15,23-25] y ácidos [26].

Los sistemas de transporte generales son aquellos en los cuales la actividad, y/o la síntesis de los mismos, responde a los cambios en la fuente de nitrógeno. La actividad de estos sistemas no es apreciable cuando las levaduras se cultivan en medios que contienen una fuente abundante de nitrógeno, como el amonio, la glutamina, o la asparagina [27,28] y se expresan o inducen cuando las levaduras se cultivan en medios que contienen una fuente pobre de nitrógeno, como la prolina o la urea [29]; en estas condiciones los aminoácidos son transportados eficientemente al interior de las células. Estos sistemas requieren de la síntesis *de novo* de las proteínas transportadoras durante los procesos de inducción [16].

4. LA PERMEASA GENERAL DE LOS AMINOACIDOS (GAP1)

Este sistema de captación pertenece a los que se conocen como sistemas generales o adaptativos, en los que las actividades y/o la síntesis se regulan por la fuente de nitrógeno. La especificidad de esta permeasa general es muy amplia: entre sus sustratos se encuentran muchos de los isómeros D- y L- de los aminoácidos básicos, neutros y ácidos [27-30]. Las mutaciones que inhiben específicamente la actividad de esta permeasa se localizan en un locus único, el locus GAP1, que se sugiere es el gene estructural de la permeasa [31].

Actualmente, el gene que codifica para la GAP1 ha sido clonado y secuenciado; los análisis de su secuencia indican que posee un marco de lectura abierta de 601 codones que codifican para una proteína con un peso molecular de 65,578 daltones. Esta proteína es altamente hidrofóbica, como se esperaría para una proteína integral de la membrana, y predice 12 regiones o segmentos transmembranales. La secuencia de aminoácidos de la GAP1 muestra una alta similitud con otros transportadores de aminoácidos de las levaduras, lo que sugiere un origen evolutivo común para estas

permeasas [32] (Figura 3).

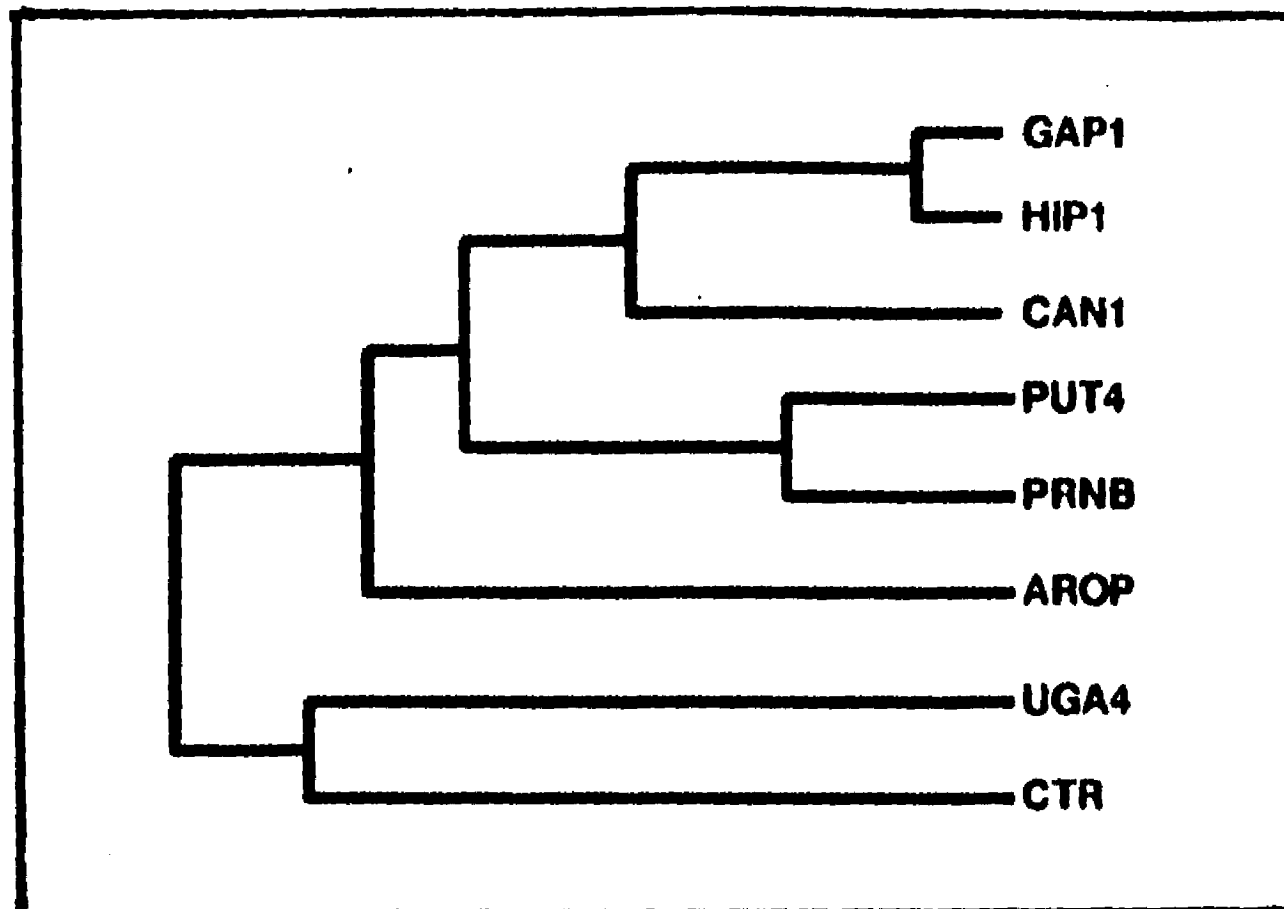


FIGURA 3. Relaciones filogenéticas de los transportadores de compuestos nitrogenados. Las relaciones se basan en las similitudes que presentan las diversas permeasas (P) de *S. cerevisiae*: (GAP1) permeasa general de los aminoácidos; (CAN1) P de arginina; (PUT4) P de prolina; (UGA4) permeasa de GABA; (CTR) P de colina. O de las permeasas de otros organismos: (PRNB) P de prolina de *A. nidulans*; (AROP) P general de aminoácidos aromáticos de *E. coli* K-12. Tomado de Grenson, 1992 [20].

Uno de los aspectos más interesantes de la permeasa general GAP1 es su regulación, que se ha elegido como modelo para explicar y entender los mecanismos de regulación por la fuente de nitrógeno.

5. REGULACION DEL TRANSPORTE DE LOS AMINOACIDOS. MECANISMO DE LA REPRESION CATABOLICA NITROGENADA (NCR).

Una característica importante de los transportadores de los aminoácidos es que tanto la expresión de los genes estructurales de las permeasas, como la actividad de las permeasas correspondientes, se controlan y modulan a través de diferentes tipos de sistemas de regulación. En las levaduras del género *Saccharomyces cerevisiae*, la síntesis de muchas de las permeasas de los aminoácidos se inhibe por un mecanismo de regulación general denominado Represión Catabólica Nitrogenada (NCR), que se lleva a cabo en células que se encuentran en presencia de fuentes de nitrógeno primarias como los iones amonio, la asparagina y la glutamina [20].

5.1 Permeasas sensibles a la NCR

El estudio de la regulación de las permeasas sensibles a NCR se realiza en células cultivadas en medios que contienen prolina o urea como fuentes de nitrógeno, es decir, en ausencia de NCR. La expresión de estas permeasas es constitutiva, por lo que no se requieren inductores para la síntesis de permeasas como: la permeasa general de aminoácidos (GAP1), la permeasa de prolina (PUT4), o la permeasa de ureidosuccinato-alantoato (UEP1/DAL5) [27]. Algunos aspectos de este mecanismo de síntesis constitutiva se han estudiado en esta última permeasa; los análisis de las secuencias de DNA cercanas al extremo 5' del gene UEP1/DAL5 han permitido identificar dos regiones pequeñas necesarias para su expresión completa: secuencias de activación localizadas antes del sitio de iniciación de la transcripción (UAS) formadas por pentanucleótidos 5'-GATAA-3', más las secuencias laterales en ambos lados del pentanucleótido, que son esenciales para la actividad de las UAS [33,34]. Varias repeticiones de estas UAS también se han detectado en las secuencias de DNA cercanas al extremo 5' de los genes GAP1 y PUT4, aunque aún no se ha estudiado su función [32,35]. La expresión constitutiva de estos genes también requiere de la

presencia del producto del gene GLN3, que es un activador pleiotrópico de la transcripción de genes involucrados en el metabolismo nitrogenado [36]. La proteína codificada por este gene contiene una secuencia rica en residuos de cisteína que, *in vitro*, forman una región de unión al DNA [37]. Se ha sugerido que el gene GLN3 codifica para una proteína reguladora que se une a las secuencias GATAA UAS de diversos genes de las permeasas [37].

5.2 Inactivación Catabólica Nitrogenada (NCI) y Represión Catabólica Nitrogenada (NCR): Mecanismos de regulación de los sistemas de captación de compuestos nitrogenados.

En *Saccharomyces cerevisiae*, la regulación de los sistemas de transporte de aminoácidos sujetos a represión catabólica se realiza a través de dos mecanismos que actúan en conjunto: la Inactivación Catabólica Nitrogenada (NCI) y la Represión Catabólica Nitrogenada (NCR), que pueden distinguirse entre ellos por mutaciones de los elementos implicados.

5.2.1 Inactivación Catabólica Nitrogenada (NCI).

Este mecanismo de regulación se ejerce mediante un control negativo y un control positivo de la actividad de las permeasas.

A) Control Negativo. La GAP1 se inactiva rápida, progresiva y completamente, después de la adición de iones amonio. Esta inhibición es reversible y se puede impedir por diversas mutaciones que eliminan el efecto del amonio para una permeasa específica por estar en el gene estructural de la permeasa [38]. Estas mutaciones se denominan: *pgr-GAP1* [31]; *pgr-PUT4* y *gar-UGA4* (permeasa de GABA) [20]; se ha descrito que afectan el sitio receptor de la NCI de las permeasas y se encuentran localizadas en el extremo carboxilo terminal de la proteína. Otras mutaciones no están en los genes estructurales, es decir, actúan a distancia y a

diferencia de la anteriores, sus efectos son pleiotrópicos: estas mutaciones se denominan *npi1* y *npi2* (inactivador de las permeasas de nitrógeno). En este sentido, parece que la inactivación por amonio implica la participación de varias proteínas que actúan a distancia y que tienen un efecto más amplio sobre las permeasas sensibles al amonio [20]. Recientemente, se clonó y secuenció el gene que codifica para la proteína NPI1 de *Saccharomyces cerevisiae* [39]; el análisis de su secuencia indica que posee un dominio con una alta similitud con el extremo carboxilo terminal de un componente de la ligasa de ubiquitina, proteína implicada en las vías de degradación de las proteínas que deben ser removidas de las células. Las permeasas que se encuentran sujetas a inactivación por amonio son: PUT4, GAP1, UEP/DAL5, GNP1 (permeasa de glutamina) [26], MEP1 y MEP2 (permeasas de metilamina/amonio) [40] y la UGA4 GABA [20]. El hecho de que una mutación que afecta a las permeasas y las hace insensibles a la inactivación por amonio, refuerza la idea de que la inactivación por este ion implica una modificación química de la permeasa.

B) Control positivo. Una condición indispensable para que la GAP1 se encuentre activa en células no reprimidas, es la integridad del gene NPR1 (reactivador de las permeasas de nitrógeno). Esta proteína tiene un efecto pleiotrópico; es decir, las mutaciones en este gene no solo afectan a la GAP1, sino que otras permeasas se inactivan parcial o totalmente. Todas las permeasas que requieren de la participación de la proteína NPR1 son sensibles al amonio. El efecto del gene NPR1, aunque es más amplio que el de los NPI, sólo involucra a las permeasas y parece ser un componente necesario para estos sistemas de transporte [26]. Esta proteína ejerce un control positivo en la actividad de las permeasas y se requiere solamente para contrarrestar el efecto de inactivación de los productos de los genes NPI. Otras de las razones por las que se sugiere que es una proteína reguladora se basa en su secuencia, que corresponde a la de una proteína cinasa. Se ha sugerido que puede fosforilar a la permeasa o inhibir las propiedades de inactivación de uno de ambos productos de los genes NPI [41].

5.2.2 Regulación de la actividad de la Permeasa General de Aminoácidos (GAP1)

Con base en los datos de los productos génicos involucrados en la regulación positiva y negativa de las permeasas, se ha establecido un modelo de la regulación de la GAP1 [42] (Figura 4):

Cuando las levaduras se cultivan en un medio no represor, es decir, usando prolina como fuente de nitrógeno, la GAP1 se sintetiza, pero es inactivada por el mecanismo NPI que actúa en el sitio PGR de la GAP1. Este control negativo mantiene a la GAP1 en forma inactiva hasta que interviene el producto del gene NPR1. En las condiciones mencionadas se alcanza un equilibrio entre el efecto negativo de las proteínas NPI y el efecto positivo de la proteína NPR1.

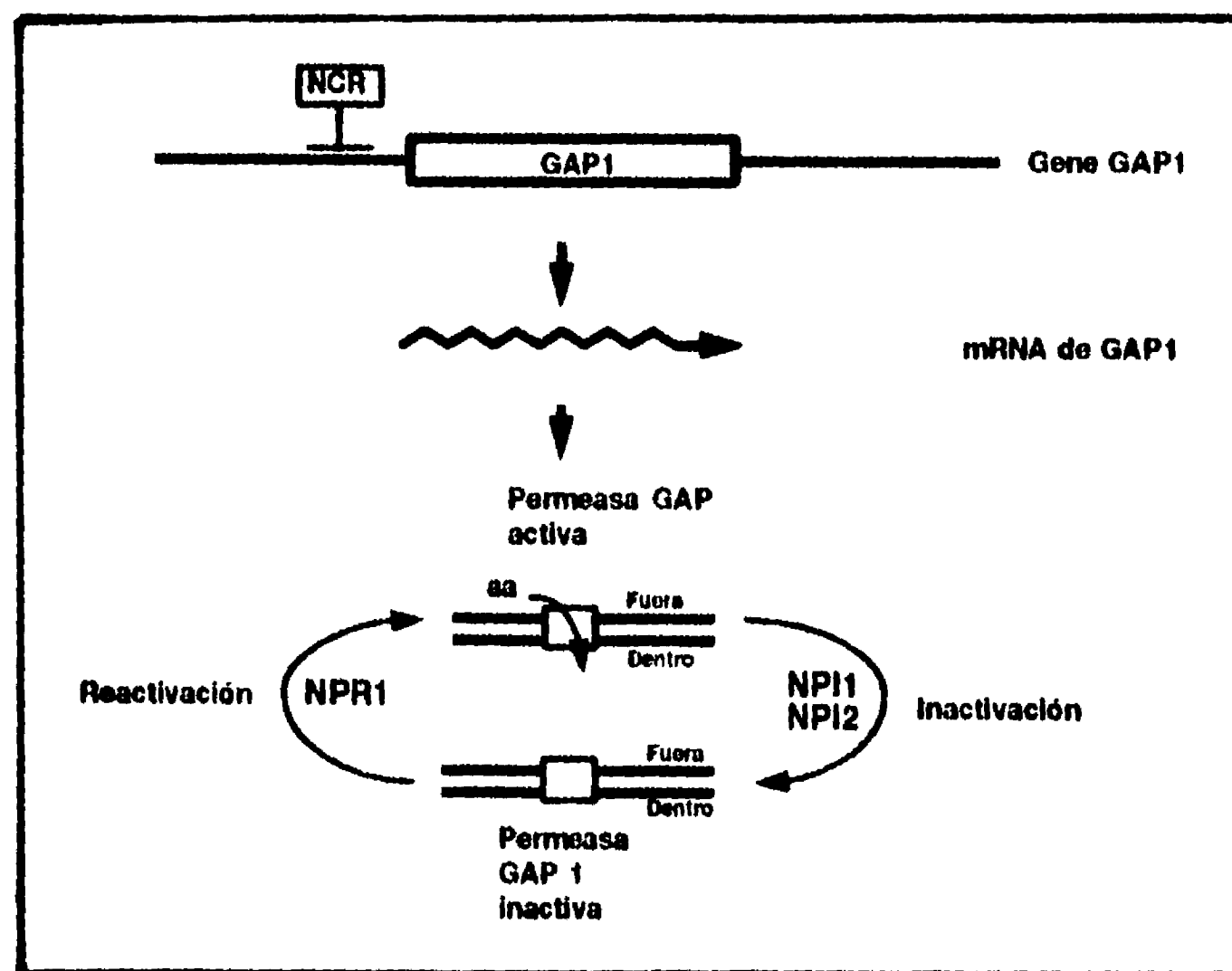


FIGURA 4. Modelo de la regulación de la Permeasa General de los Aminoácidos (GAP1). La represión de la síntesis de la permeasa se indica en la parte superior de la figura; el proceso de inactivación y reactivación se representa en la parte inferior de la figura. Tomado de Grenson, 1992 [20].

Posteriormente, la adición de iones amonio, conduce a la inactivación de la permeasa preexistente por el mecanismo NPI, impidiendo que el mecanismo reactivador NPR1 pueda actuar, ya sea porque los iones amonio (o un derivado de ellos) inactivan a la proteína NPR1, o porque activan al sistema NPI que se hace predominante.

5.2.3 Represión Catabólica Nitrogenada (NCR)

La represión catabólica nitrogenada de la síntesis de la GAP1, se ha establecido en cepas que tienen mutaciones de los genes NPI: *npi1* y *npi2*, que eliminan el mecanismo de inactivación de la permeasa. En estas mutantes se ha demostrado que la síntesis de la permeasa se inhibe en células cultivadas en presencia de iones amonio. La represión de la síntesis de diversas permeasas (GAP1, PUT4, UEP1/DAL5) se lleva a cabo a nivel de la transcripción o de la cantidad del mRNA, que es alto en las células cultivadas en presencia de prolina, pero muy bajo en aquellas cultivadas en amonio o asparagina como fuentes de nitrógeno [32,33,43]. Para iniciar la NCR, los iones amonio deben ser transformados en glutamina; se ha descrito que al disminuir la síntesis endógena de la glutamina, diversas enzimas y permeasas se desreprimen aún en presencia de concentraciones altas de amonio [38]. Dado que la represión se restablece al adicionar glutamina en el medio, parece ser que este aminoácido es un efector crucial implicado en esta regulación.

Otro producto génico que participa en la represión de la síntesis de las permeasas es el producto del gene URE2/GDHCR (represor catabólico de la glutamato deshidrogenasa). La proteína codificada por este gene inhibe la expresión de una gran cantidad de enzimas que participan en el catabolismo de compuestos nitrogenados en células cultivadas en presencia de amonio. Las mutaciones que afectan a este gene (*ure2/gdhCR*) conducen a la liberación de esta inhibición [44]. El producto del gene URE2/GDHCR actúa como un regulador negativo que impide la transcripción de los

genes de las permeasas en presencia de amonio. Se ha descrito que el producto de este gene ejerce su efecto al inhibir al producto del gene GLN3 que, como se mencionó antes, es un activador de la transcripción de los genes regulados por nitrógeno [45].

La transcripción de la GAP1 se regula entonces por el sistema GLN3/URE2 dependiendo de la disponibilidad de la glutamina; y también puede activarse por un sistema independiente, sólo en ausencia de glutamina, de glutámico o de amonio. En este sentido, se ha sugerido que la inactivación de la GAP1 libera una señal intracelular que interrumpe su expresión, lo que parece ser una respuesta fisiológica razonable cuando las células se encuentran en un medio con fuentes de nitrógeno abundantes. Otra posibilidad es que la inactivación de la GAP1 inhiba la entrada de otros aminoácidos, previniendo de este modo la inducción de las enzimas que los degradan a glutámico o amonio; al mismo tiempo, la inactivación de la GAP1 puede constituir una señal que detiene su expresión, impidiendo que se sintetice en exceso. Lo anterior sugiere que la presencia de la GAP1 es necesaria para producir una señal que detiene su expresión [36].

6. ALGUNOS ASPECTOS DEL TRANSPORTE DEL POTASIO Y DEL AMONIO EN LAS LEVADURAS

6.1 Transporte del potasio

La salida de protones a través de la bomba, impulsa la captación de iones que mantienen la neutralidad eléctrica de la membrana plasmática; la captación de potasio es la manera más eficiente de realizar este proceso [46]. Se sabe que esta actividad de captura de K^+ y expulsión de H^+ está indirectamente acoplada, ya que ambos flujos se realizan por acarreadores diferentes. La energía requerida para la captación del potasio proviene del gradiente eléctrico que se establece a través de la membrana de las levaduras por la bomba de protones. Ambos flujos (la salida de H^+

y la captación de K^+) se realizan en una proporción de $1K^+$ por cada H^+ [47]. Se ha calculado que el potencial eléctrico generado a través de la membrana plasmática puede llegar a ser hasta de -180 mV, con el interior negativo [48,49]; este potencial es lo suficientemente grande para generar y mantener un gradiente de concentración de K^+ de 1,000 veces, que es responsable tanto de la alta concentración intracelular de este ion (100 a 250 mM o más), como de la capacidad de las levaduras para crecer en presencia de niveles micromolares de potasio [47,50]. Debe haber, sin embargo, otros factores involucrados en el transporte de este catión, que le permiten alcanzar diferencias de concentración hasta de 10,000 veces en el interior, con respecto al exterior.

El transporte del potasio es un proceso muy complejo; se han descrito 2 sistemas de captación de este ión: uno de alta afinidad y alta velocidad ($K_m=24 \mu M$; $V_{max}= 34 \text{ nmol mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$); y el otro de baja afinidad y baja velocidad ($K_m=2 \text{ mM}$; $V_{max} = 7 \text{ nmol mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$) [50].

Otra característica interesante es que los cambios en el contenido de potasio intracelular, conducen a diferencias en el influjo y eflujo del catión; una disminución en el potasio intracelular conduce a un aumento en su captación y a la disminución de su salida [50,51].

Hasta la fecha no está claro si el eflujo de potasio se realiza a través del mismo sistema que el de captación; sin embargo se ha sugerido que este eflujo se realiza a través de canales de potasio activados por el voltaje [52].

6.2 Transporte del amonio

El amonio constituye una fuente de nitrógeno importante en los microorganismos eucariontes, por lo que su utilización está ampliamente distribuida. Una dificultad para estudiar el mecanismo de su transporte, es que no se cuenta con un radioisótopo de nitrógeno. La estrategia que se ha empleado es medir la captación de un análogo de amonio, la metilamina, que está marcado radioactivamente. El

transporte de este compuesto en *Saccharomyces cerevisiae* se realiza mediante un sistema que opera a pH de 6-6.5, lo que sugiere que el ion amonio es acumulado en su forma cuaternaria. La captación de la metilamina se inhibe de manera competitiva por los iones amonio y por la urea, y de manera no competitiva por los aminoácidos. Este sistema requiere de la presencia de glucosa para su actividad y se inhibe por desacoplantes como el CCCP (carbonil cianida m-clorofenil hidrazona) y el DNP (2,4-dinitrofenol) [53].

Cuando las levaduras se cultivan en medios que contienen prolina como fuente de nitrógeno, se ha observado la presencia de un segundo sistema de captación de baja afinidad para la metilamina, que parece ser responsable de su acumulación intracelular a niveles tóxicos [40]. En la literatura se ha descrito que existen al menos 3 sistemas para la captación de la metilamina, y por lo tanto del amonio, cada uno de ellos con diferentes afinidades y velocidades de transporte [40].

En otros estudios [49] se describió que el transporte del amonio está indirectamente acoplado a la bomba de protones, y que la velocidad de captación de este catión es máxima cuando las células son suplementadas con fuentes de carbono que activan a la bomba de protones. Además, estos investigadores sugieren que el transporte del amonio puede ser conducido por el potencial de membrana de la misma manera que ocurre con el del potasio.

6.3 Efectos del potasio en el transporte de los aminoácidos y relaciones entre los efectos del potasio y el amonio

Cuando el potasio se encuentra presente en el medio de preincubación, aumenta la captación de diversos aminoácidos [54]. Este aumento en el transporte de la leucina, al preincubar a las levaduras con potasio tiene las siguientes características [55]:

1) En levaduras preincubadas en presencia de diferentes concentraciones de potasio (μM), se observó un incremento en la captación del aminoácido y se alcanzó una captación máxima a una concentración igual o mayor a 10 mM.

2) El efecto del potasio es significativamente mayor en relación con otros cationes monovalentes. La comparación entre el radio iónico y la eficacia de diversos cationes monovalentes para aumentar el transporte de la leucina indica que existe el mismo patrón de selectividad que para el transporte del catión [56].

3) El potasio se acumula en el interior de las levaduras conduciendo a una mayor salida del catión durante la captación del aminoácido, en comparación con las levaduras que no se preincuban con potasio.

4) La preincubación en presencia de potasio (y de glucosa) requiere de un período prolongado (alrededor de 60 min) para observar una captación significativa de los aminoácidos, posiblemente para que se inicie la síntesis *de novo* de los sistemas de transporte.

5) Durante la preincubación con potasio hay un incremento importante en la síntesis de proteínas, en particular de la permeasa general de los aminoácidos.

6) La modificación en la actividad de los sistemas de transporte de los aminoácidos por el potasio se debe posiblemente al aumento en la velocidad con que éstos son sintetizados.

Estos resultados indican que la preincubación de las levaduras en presencia de potasio, tiene un efecto importante en la regulación del transporte de la leucina, en particular de la GAP1.

La primera parte del trabajo [55], nos permitió descubrir que los efectos de la preincubación de las levaduras en presencia de amonio y/o potasio en el transporte de la leucina muestran las siguientes características:

1) La presencia del amonio en el medio de preincubación inhibe la actividad tanto de los sistemas específicos de la leucina como de la GAP1. Contrario a lo descrito, en el sentido de que los sistemas específicos no eran inhibidos por el amonio [27,32], los sistemas específicos para la leucina no son constitutivos, dado que la actividad de transporte sólo se observa después de preincubar a las levaduras en presencia de glucosa y a que el amonio inhibe su actividad.

2) La preincubación en presencia de concentraciones equimolares de potasio y amonio, disminuye o impide el efecto inhibitor del amonio sobre los acarreadores de los aminoácidos; lo que sugiere que el potasio puede estar bloqueando la acción del amonio en algún sitio específico.

3) La presencia continua del potasio en el medio de preincubación se requiere para disminuir la inhibición producida por el amonio, puesto que independientemente de que se preincube con glucosa o con potasio, la adición de amonio produce un rápido decaimiento en la captación de la leucina.

La presencia del potasio parece proteger de la inactivación total a los sistemas de transporte de los aminoácidos. Es posible que este catión esté relacionado con la expresión y la protección del sistema de transporte general de los aminoácidos (GAP1) de las levaduras.

El potasio podría actuar a diferentes niveles relacionados con los mecanismos en los que participa el amonio; es decir, en el mecanismo de inactivación-reactivación de la GAP1 o en el mecanismo de NCR:

1) Desplazando el equilibrio entre los sistemas activador-inactivador en favor del sistema activador.

2) Incrementando la transcripción de los mensajeros que codifican para los transportadores de los aminoácidos, en particular de la GAP1, puesto que el aumento observado en la síntesis general de proteínas producido por el potasio [55] puede ser reflejo de un aumento en el nivel de los mensajeros de los aminoácidos en las levaduras (recuérdese que el amonio inhibe la transcripción del RNA mensajero de la GAP1 [32]).

3) Aumentando la actividad y/o la síntesis de la permeasa general de los aminoácidos.

4) O protegiendo estos sistemas al competir con el amonio por algún sitio específico de acción.

Este conjunto de posibilidades con respecto al mecanismo de acción del potasio en el transporte de los aminoácidos, nos condujo a continuar el estudio de la regulación del transporte mediada por el potasio. El interés en realizar este trabajo radica en contribuir a una mejor comprensión de las características que controlan el transporte de los solutos en los microorganismos eucariontes.

II OBJETIVOS

- ♪ Continuar con el estudio de los efectos del potasio sobre el transporte de los aminoácidos en las levaduras.

- ♪ Estudiar la regulación de la Permeasa General de los aminoácidos (GAP1) en levaduras preincubadas en presencia de potasio, con el objeto de determinar el nivel en el que actúa este catión monovalente.

- ♪ Determinar si la preincubación en presencia del potasio afecta la transcripción del gene que codifica para la Permeasa General de los Aminoácidos de las levaduras.

- ♪ Establecer si el potasio aumenta la actividad y/o la síntesis de la Permeasa General de los Aminoácidos.

- ♪ Definir si existe un sitio específico de acción para el potasio y el amonio.

III MATERIAL Y METODOS

1. CEPAS Y PLASMIDOS

Las cepas de levadura que se usaron en esta parte del trabajo pertenecen al género *Saccharomyces cerevisiae* (Tabla 2). La cepa XT300.3A es una levadura silvestre; el resto de las cepas son levaduras con mutaciones en el mecanismo de inactivación-reactivación (NCI) de la GAP1, aisladas de la cepa silvestre Σ 1278b.

TABLA 2. Cepas de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*

Cepa	Fenotipo	Donación
XT300.3A	MAT α , <i>ade</i> _{2,1}	Rodríguez-Navarro, A.
21.994b	<i>npr1,ura3</i>	Grenson, Marcelle
25.126a	<i>npr1,npi1,ura3</i>	"

El plásmido pYA102, contiene una parte del gene *tcm1* que codifica para la actina en el fragmento de 1.5 Kb flanqueado por los sitios BamHI y HindIII; esta sonda de actina se empleó como control interno en los análisis de RNA mensajeros (amablemente proporcionado por la Dra. A. González).

El plásmido pMDB o pJCJ252 contiene al gene completo de 4.2 Kb, que codifica para la permeasa general de los aminoácidos (GAP1), flanqueado por 2 sitios XhoI (gentilmente proporcionado por la Dra. M. Grenson). En la Figura 5, se muestran las 2 sondas utilizadas en este trabajo.

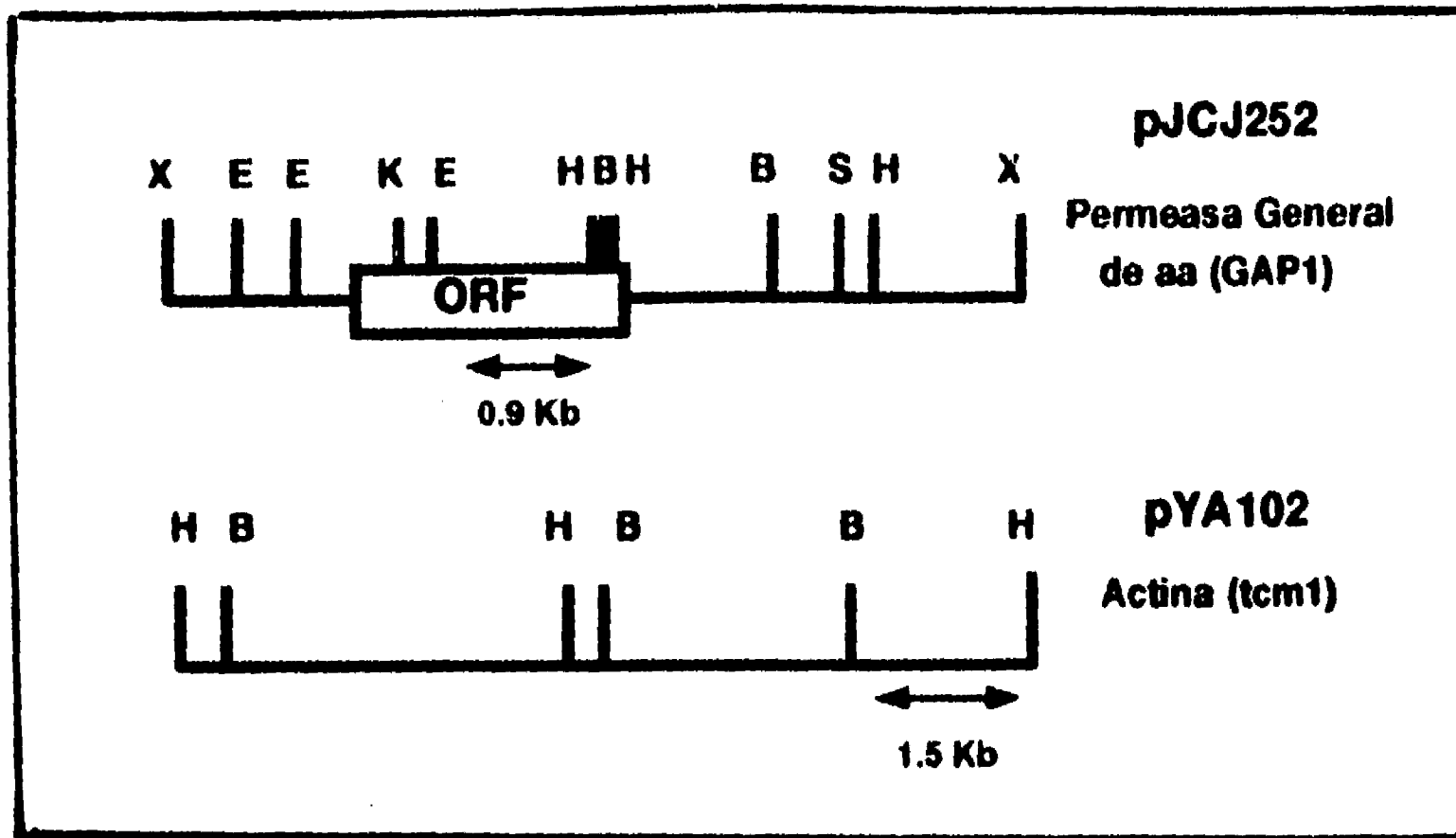


FIGURA 5. Sondas de DNA que codifican para la GAP1 y la Actina. Se indican los fragmentos de ambos genes que se usaron para la hibridación con el RNA total de las levaduras. Los sitios de restricción se representan como: X, XhoI; E, EcoRI; K, KpnI; H, HindIII; B, BamHI; S, SphI.

2. CULTIVO DE LAS LEVADURAS

Las levaduras se cultivaron durante un período de 24 a 26 horas a 30 °C (precultivo). Posteriormente se inocularon en un volumen final de 500 ml y se cosecharon en la fase estacionaria temprana de crecimiento (13-15 horas para la cepa silvestre; 22 hrs. para la mutante *npr1*; y 18 hrs. para la doble mutante *npr1,npi1*).

El medio de cultivo que se usó fue un medio definido (Bacto Yeast Nitrogen Base. DIFCO MANUAL, X Ed.) que contiene glucosa y amonio como fuentes de carbono y nitrógeno respectivamente, sales, elementos traza y vitaminas, suplementado con sulfato de adenina (15 mg/ml) . Para el cultivo de las levaduras con mutaciones se incluyó uracilo (25 µg/ml) .

Posterior al cultivo de las células, se lavaron 2 veces por centrifugación con agua bidestilada y se resuspendieron al 50% (P/V) en agua bidestilada.

3. ENSAYO DE CAPTACION DE LOS AMINOACIDOS Y DE LA METILAMINA

La suspensión de levaduras, a la densidad requerida, se preincubó durante 60 minutos a 30 °C en un medio con amortiguador MES-TEA 20 mM pH 6.0 y glucosa 150 mM (control), más las adiciones de los cationes, a las concentraciones que se indiquen en cada caso. Una vez finalizada la incubación, las células se centrifugaron, la pastilla se resuspendió en el medio control y se incubó entre 1-3 minutos a 30 °C. Transcurrido este tiempo se adicionó el aminoácido o la metilamina marcados radiactivamente y a intervalos de tiempo determinados se filtró una muestra y se lavó con 15 ml del sustrato frío en filtros Millipore con poro de 0.45 µm de diámetro. Los filtros se secaron a temperatura ambiente y se colocaron en viales que contenían 5 ml de líquido de centelleo. La radiactividad incorporada se midió en un Contador de Centelleo Líquido Packard Modelo Tri-carb.

4. INCORPORACION DE LOS AMINOACIDOS A LA SINTESIS DE PROTEINAS TOTALES

Las levaduras se preincubaron por diferentes tiempos a 30 °C, en el medio control más las adiciones necesarias, en presencia de 80 µM de L-citrulina radiactiva. En los tiempos indicados, se tomaron alícuotas y se mezclaron con 1 ml de TCA (ácido

tricloroacético) al 10%, se dejaron a 4 °C durante 60 minutos y posteriormente se determinó la incorporación del aminoácido a las proteínas, filtrando la mezcla y lavando con 15 ml de L-citrulina 5 mM en filtros Millipore de 0.45 µm de diámetro.

En donde se indica, la síntesis de las proteínas se inhibió al adicionar cicloheximida 100 µM antes, durante o después de la preincubación en presencia de glucosa o de potasio 10 mM. En los tiempos indicados se tomó una alícuota, se centrifugó y se resuspendió en el medio control. Se adicionó el aminoácido radiactivo durante 2 minutos, se filtro y se lavó como se indicó antes.

5. OBTENCION DE LOS PLASMIDOS Y LAS SONDAS

5.1 Maxipreparación de DNA de los plásmidos

El medio de cultivo empleado para la purificación del DNA está compuesto como sigue: 0.5% de extracto de levadura, 1% de bacto triptona, 0.5% de NaCl, 0.07% de K₂HPO₄, 0.03% de KH₂PO₄ y 0.1% de glucosa. Para el medio sólido se adicionó agar al 2 %. Ambos medios se esterilizaron en la autoclave. Cuando fué necesario se adicionó ampicilina (50 µg/ml) esterilizada por filtración.

La purificación se realizó utilizando los métodos descritos en Sambrook y cols., 1989 [57]. Las bacterias se cultivaron toda la noche en agitación a 250 rpm; posteriormente se cosecharon y se resuspendieron en una solución de glucosa 50 mM, Tris-HCl 25 mM, EDTA 10 mM, pH 8.0. Las células se lisaron por el método de la lisis alcalina y posteriormente el DNA del plásmido se obtuvo por el método de precipitación con polietilén glicol. El DNA obtenido se resuspendió en amortiguador TE (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM pH 7.6), se verificó su pureza en un gel de agarosa al 1 % en TBE (Tris-borato 45 mM, EDTA 10 mM pH 8.0) y se almacenó a -20 °C.

5.2 Digestión con enzimas de restricción

Para obtener los fragmentos del DNA de los genes de actina y de la GAP1, los plásmidos se digirieron con las enzimas de restricción correspondientes (Figura 5). El plásmido pJCJ252 que posee el gene de la GAP1 se digirió con las enzimas EcoRI y HindIII para obtener el fragmento de 0.9 Kb, que es parte del marco de lectura abierto del gene. El plásmido pYA102 que contiene al gene de la actina se digirió con las enzimas BamHI y HindIII para purificar el fragmento de 1.5 Kb. Por regla general, una unidad de enzima de restricción, digiere un microgramo de DNA durante una hora de incubación a 37°C. Posteriormente, la correcta digestión de los plásmidos se verificó en minigeles de agarosa al 1%/TBE y se almacenó a -20 °C.

5.3 Purificación de las sondas de DNA

El DNA de los plásmidos digeridos previamente, se corrió en geles grandes de agarosa al 1%/TBE. Una vez separada la banda de elección, el gel se cortó en la parte inmediatamente inferior a ella y se rellenó con agarosa de bajo punto de fusión al 0.6%, se dejó gelificar 15 min a 4 °C y se siguió la electroforesis a 50-60 volts hasta que la banda migró a la agarosa de bajo punto de fusión. Se cortó la banda y se incubó a 65 °C hasta fundir la agarosa, se adicionó 1/10 vol. de NaCl 5 M, se mezcló bien y se dejó otros 5 min a 65 °C; posteriormente se incubó a 37 °C, 5 min. En este tiempo se saturó fenol con NaCl 1 M, con el cual se extrajo el DNA del fragmento obtenido de la agarosa fundida. Se extrajo a temperatura ambiente con PCI (fenol-cloroformo-isoamílico, 25:24:1) y se precipitó con 1 vol. de isopropanol más 10 µg de tRNA durante 2 hrs a -20 °C. Se lavó y se resuspendió en un volumen adecuado de agua o TE. Se verificó en un minigel de agarosa al 1 %/TBE y se almacenó a -20 °C.

5.4 Marcaje de las sondas por "Marcado al azar"

Las sondas de DNA se marcaron con α -³²dCTP utilizando el sistema de marcaje

al azar de GIBCO-BRL. Básicamente, 80 nanogramos del DNA purificado se desnaturalizaron, hirviendo en baño de agua por 10 minutos y colocando inmediatamente en hielo. Se adicionaron los nucleótidos, incluyendo el marcado con fósforo radiactivo (α - 32 dCTP) más el amortiguador. Se mezcló con cuidado y se adicionó la enzima DNA polimerasa I, se mezcló y se incubó a temperatura ambiente durante 1.5 horas. La reacción se detuvo añadiendo un amortiguador que contenía Na_2EDTA 0.2M, pH 7.5. Finalmente, para eliminar los nucleótidos no incorporados, las sondas marcadas con ^{32}P se filtraron en una columna de Sephadex G-50 equilibrada con Tris HCl 10 mM, pH 8, NaCl 50 mM, EDTA 0.1 mM pH 8 y se colectaron por centrifugación.

6. REPLICAS TIPO NORTHERN

6.1 Minipreparación de RNA total

Se modificó el método descrito por Carlson y Botstein, 1982 [58]. Las levaduras se cultivaron como se describió previamente; después de lavarlas con agua destilada, se resuspendieron en un medio que contenía glucosa 150 mM y MES-TEA 20 mM pH 6, al que se le adicionó KCl 10 mM o NH_4Cl 10 mM o KCl/ NH_4Cl 5 mM. Se incubó durante diferentes tiempos (20, 40, 60 y 80 min) a 30 °C. Las células obtenidas en estos tiempos se lavaron con agua/DEPC (dietilpirocarbonato, 1 $\mu\text{l}/\text{ml}$) y se recuperó la pastilla celular en tubos de microfuga. Se resuspendió en 470 μl de amortiguador de lisis (acetato de sodio 100 mM, MgCl_2 5 mM, pH 5.2) y rápidamente se adicionaron 25 μl de SDS 20 % más 5 μl de DEPC. Se extrajo 3-4 veces con 500 μl de PCI agitando en el vórtex 1 min, incubando 5 min a 65 °C, pasando a baño de hielo seco/etanol hasta congelar, centrifugando 10 min en la microfuga y recuperando la fase acuosa. En la última extracción la fase acuosa se pasó a un tubo que contenía 5 μl de MgCl_2 100 mM. Se extrajo 1 vez con cloroformo-isoamílico (25:1), se recuperó la fase acuosa y se adicionó 1/10 vol. de acetato de sodio 3M pH 5.2 más 2.5 vols. de

etanol absoluto. Se precipitó 15 min en baño de hielo seco/etanol, se lavó con etanol al 80%, se secó y se resuspendió en un volumen adecuado de agua-DEPC. Se almacenó a -70 °C.

6.2 Electroforesis del RNA

La cámara de electroforesis y los aditamentos, se limpiaron con SDS al 1% y se enjuagó con agua-DEPC. Se siguió el protocolo descrito por Sheiness y Sullivan, 1986 [59]. Se preparó agarosa al 1% en amortiguador MAE (MOPS 20 mM, NaOAc 5 mM y EDTA 1 mM pH 7); se dejó enfriar y se adicionó formaldehído al 2.2% final. Las muestras de RNA (aproximadamente 100 µg) se mezclaron con 40 µl de amortiguador de muestra (44% formamida desionizada, 5.9% formaldehído, 20 mM MOPS, 5 mM NaOAc, 1 mM EDTA, 0.4% glicerol, 0.4 mg/ml bromofenol) más 0.1% de bromuro de etidio (EtBr). Se desnaturalizaron 20 min a 65 °C y se realizó la electroforesis 4 horas a 75 volts. Posteriormente el gel se lavó 20 min en SSC 10X (NaCl 3M, citrato de sodio 0.3M, pH 7) para eliminar el formaldehído.

6.3 Transferencia a membrana de nylon

Modificado de Thomas, 1980 [60]. El gel se colocó en un puente de papel Whatman 3MM en contacto con SSC 10X. Se cubrió con la membrana de nylon Amersham y encima de ésta se colocaron 10 cm de papel absorbente, con un peso de 500 gr. Se dejó 12 hrs; posteriormente la membrana de nylon se retiró y se secó a temperatura ambiente, el RNA unido a la membrana se fijó 5 min con luz ultravioleta de baja intensidad. La membrana se guardó en una bolsa sellada a temperatura ambiente.

6.4 Hibridación

Se utilizó el método descrito por Church y Gilbert, 1984 [61]. El RNA contenido en la membrana de nylon se preincubó 1 hora a 65 °C en una solución que contenía 3 ml de fosfato de sodio 1M pH 7.2, 7 ml de SDS al 10 % y 20 µl de EDTA 0.5 M pH 8. Posteriormente se adicionaron las sondas desnaturalizadas y marcadas con α -³²dCTP y se hibridó toda la noche a 65 °C. Después de la hibridación, se hicieron los siguientes lavados: SSC 2X + SDS 0.1% (5 min a 65 °C en agitación, seguido de 30 min en las mismas condiciones); SSC 0.15X + SDS 0.1% (5 min a 65 °C en agitación, seguido de 30 min en las mismas condiciones).

6.5 Exposición de autorradiografía

El armazón para exposición se forró con plástico autoadherible para evitar que la membrana de nylon se secase. Se colocó la membrana y se eliminaron las burbujas, se estimó la marca con un contador Geiger y se puso una película Kodak X-OMAT-AR en la oscuridad. Se expuso 12 hrs a -70 °C y se reveló.

IV RESULTADOS

1. EFECTOS DEL POTASIO EN EL TRANSPORTE DE LA L-CITRULINA

En estudios anteriores se encontró que la preincubación de las levaduras en presencia de potasio conducía a un aumento en la captación de la leucina; así mismo se caracterizó el efecto de este catión sobre diversos aspectos del transporte de este aminoácido [55]. Sin embargo, el estudio de este transportador y los efectos del potasio se complicó debido a que la captación de este aminoácido se realiza a través de 3 sistemas de captación: uno de alta afinidad, uno de baja afinidad y por la GAP1 [15,25,27]; este hecho no permitió determinar o descartar cual o cuales permeasas podían ser afectadas por la preincubación con potasio.

Se tenían antecedentes de que el potasio también era capaz de aumentar la captación de otros aminoácidos [55]; por lo que se decidió caracterizar los efectos del catión en el transporte de la L-citrulina. La elección de este aminoácido se debe a que es posible discernir entre los sistemas de transporte específicos y generales, ya que su captación se realiza sólo a través de la permeasa general (GAP1) [27].

1.1 Efecto de la concentración de potasio en la captación de la citrulina

Una vez que se aseguró que la captación de la citrulina aumentaba por lo menos 2 a 3 veces en las levaduras preincubadas con potasio 10 mM, se determinó si el aumento en el transporte dependía de la concentración del potasio. Como se indica en la Figura 6, la captación de la citrulina aumenta desde concentraciones bajas de potasio y se satura a una concentración de 5-10 mM del catión, con un aumento de más de 7 veces en el transporte, en comparación con las células preincubadas en ausencia del potasio.

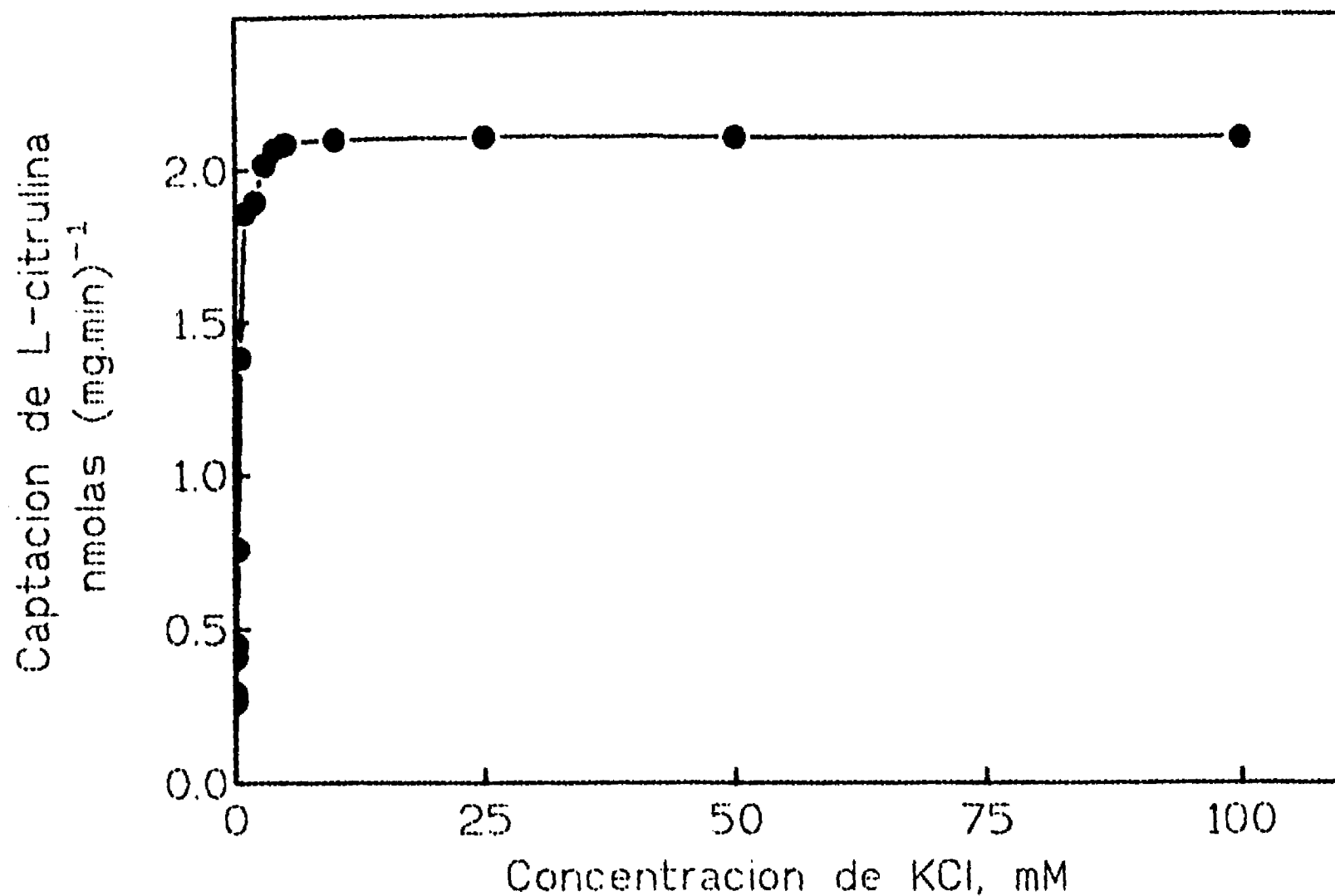


FIGURA 6. Efecto del potasio en la captación de L-citrulina. Las levaduras (XT300.3A) se preincubaron 60 minutos en el medio control (glucosa 150 mM, Mes-TEA 20 mM pH 6.0) y en presencia de concentraciones crecientes de KCl. Posteriormente se lavaron y se resuspendieron en el medio control y se adicionó 80 μ M de L-[¹⁴C] citrulina. Después de 2 min, las células se filtraron y se lavaron como se describe en los métodos.

1.2 Curso temporal de la estimulación del transporte de la citrulina

Se ha descrito que la actividad de transporte de diversos sustratos aumenta al preincubar a las células en presencia de una fuente de energía como la glucosa, durante un tiempo largo (aproximadamente 30 min) [16]. En estudios previos se encontró que la captación de la leucina requiere de una incubación de por lo menos

20 minutos para detectar su actividad [55]. Por esta razón se decidió determinar el tiempo mínimo de incubación requerido para observar el transporte de la citrulina. Las levaduras se preincubaron en el medio control y en presencia de 10 mM de potasio. En el control se observó un aumento gradual en la captación de este aminoácido a partir de los 40 minutos de incubación. Por otro lado, en las levaduras preincubadas en presencia de potasio, se observó una mayor captación de la citrulina con respecto al control, a partir de los 20 minutos de incubación (Figura 7).

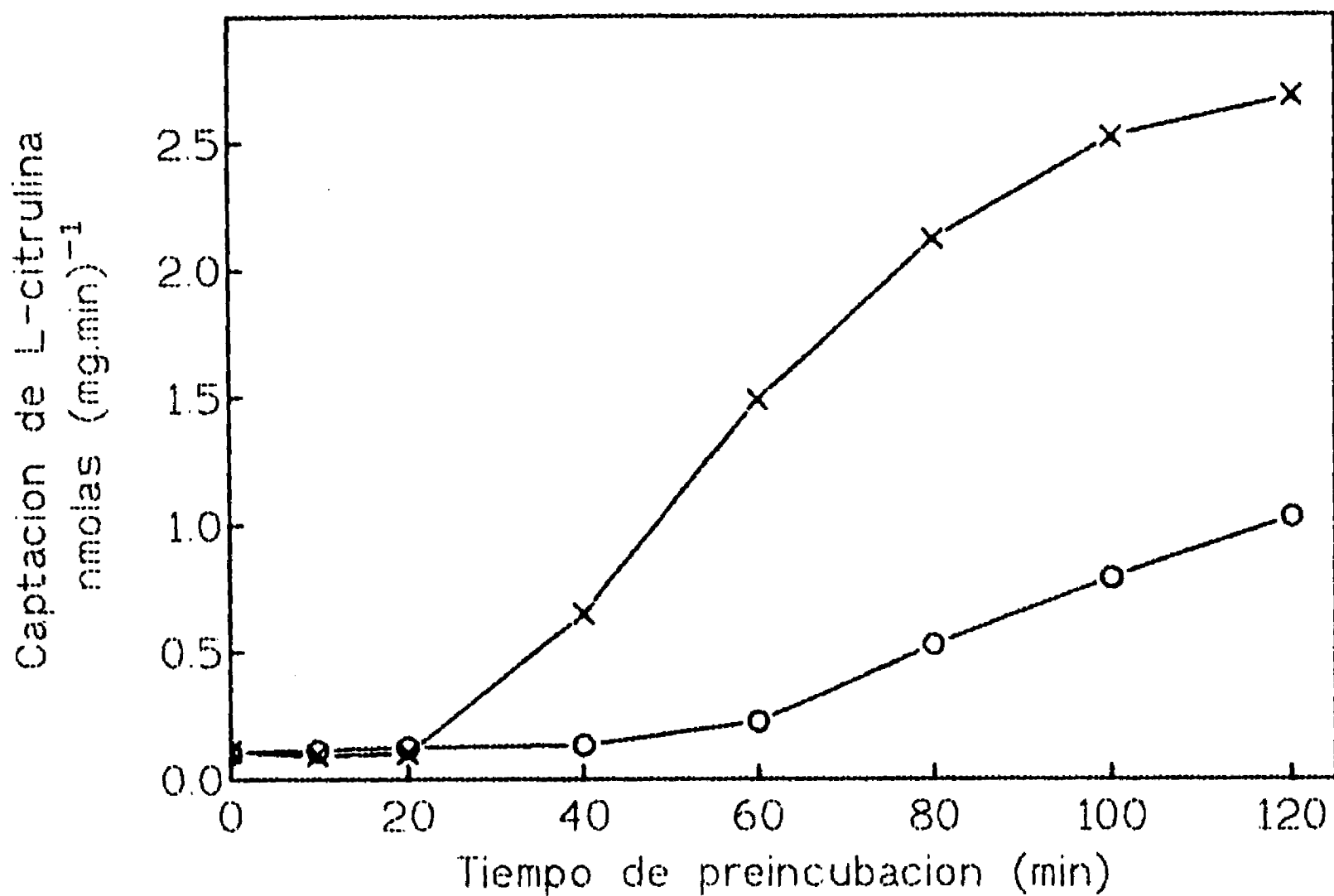


FIGURA 7. Captación de citrulina en las levaduras XT300.3A. Las células se preincubaron en el medio control (o) o en presencia de KCl 10 mM (x). A los tiempos indicados se tomó una alícuota, se lavó y se resuspendió en el medio control. Posteriormente se adicionó 80 μ M de la citrulina marcada y transcurridos 2 min se determinó la radiactividad como se describe en métodos.

Se ha descrito que el aumento en la actividad del transporte de diversos sustratos en las levaduras preincubadas con glucosa, va acompañado de un incremento paralelo en la síntesis de las proteínas [16]. Esta asociación se observó en el transporte de la leucina, en el que se encontró un aumento en la síntesis total de proteínas, que fue aún mayor si las células se habían preincubado en presencia de potasio [55]. Se midió la incorporación de la marca de la L-citrulina a la síntesis total de las proteínas en levaduras preincubadas con glucosa y en presencia de glucosa más potasio 10 mM. En la figura 8 se indica que existe la misma correlación que se describió para el transporte de la leucina [55]; es decir, hay una relación paralela entre el aumento en la actividad del transporte y la síntesis de proteínas totales en función del tiempo de preincubación, siendo éstos mayores en las células preincubadas en presencia del potasio. No obstante que la citrulina no es un aminoácido de las proteínas, su incorporación a la síntesis total de las mismas, se realiza mediante su transformación en arginina, que es un aminoácido constituyente de las proteínas.

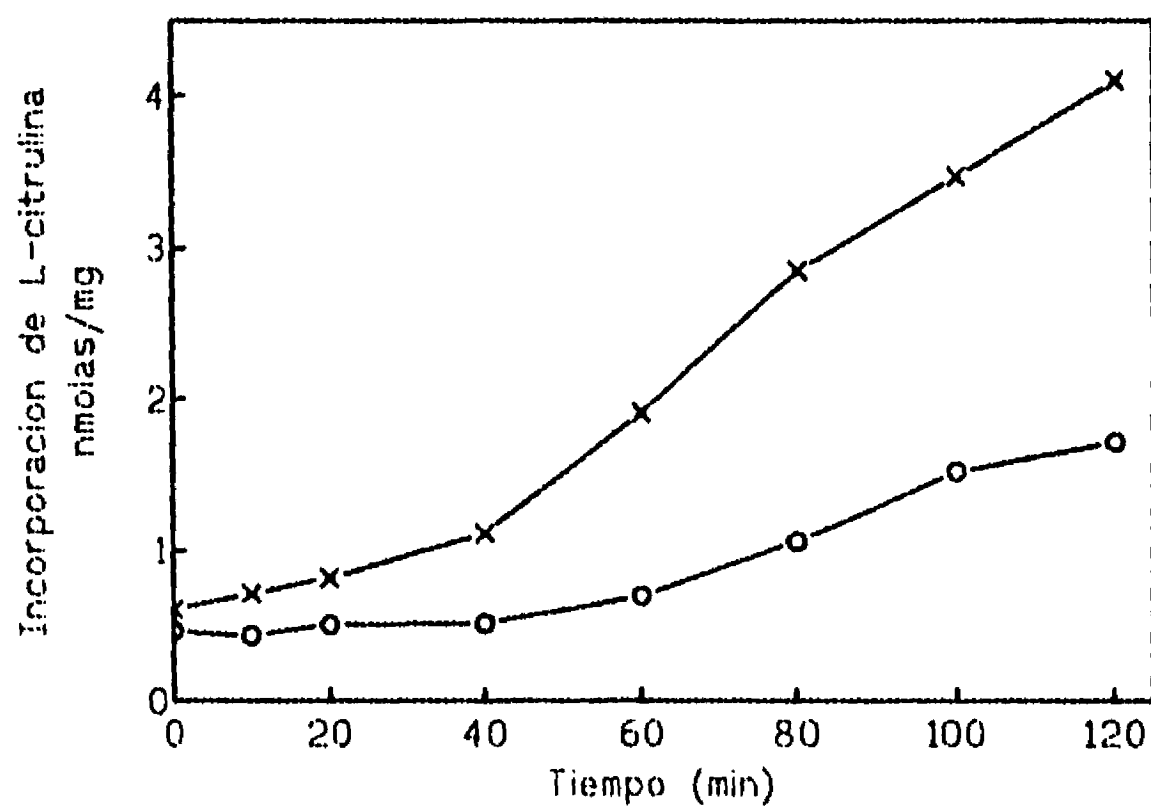


FIGURA 8. Incorporación de L-[¹⁴C] citrulina a la síntesis total de proteínas. Las levaduras se preincubaron con glucosa (o) o glucosa más KCl 10 mM (x), en presencia de 80 μ M de citrulina radiactiva. La incorporación del aminoácido se midió como se describió en los métodos.

1.3 Inhibición del transporte y de la síntesis de proteínas

Una de las características más interesantes del efecto del potasio en el transporte de los aminoácidos, es que parece estar relacionado con la síntesis *de novo* de estos acarreadores [55]. Para probar esta idea, las células se preincubaron en presencia de glucosa y de glucosa más cicloheximida 100 μM para inhibir la síntesis de las proteínas. Se tomaron alícuotas cada 20 min y se midió el transporte del aminoácido. A los 60 minutos de preincubación con glucosa, la mezcla de incubación se dividió en 3 fracciones a las que se les adicionó 1) cicloheximida 100 μM ; 2) potasio 10 mM más cicloheximida 100 μM y 3) potasio 10 mM, y se siguió la captación del aminoácido incubando a las células en estas condiciones durante 2 horas más. Una última fracción se preincubó con potasio 10 mM durante 60 minutos, posteriormente se adicionó cicloheximida 100 μM y se siguió la captación como se describe arriba.

En la figura 9, se observa que la adición de la cicloheximida al inicio de la preincubación impide la captación de los aminoácidos al comparar con las levaduras incubadas sólo con glucosa. Además, una vez activado el sistema de transporte, la adición de la cicloheximida o del potasio más cicloheximida conduce a una inhibición o inactivación del transporte de los aminoácidos. Por otro lado, la adición del potasio a las levaduras incubadas con glucosa, produce un incremento muy notable en la captación de los aminoácidos. Estos resultados confirman la hipótesis de que la preincubación en presencia de potasio aumenta la síntesis *de novo* de las proteínas acarreadoras, ya que la adición de este catión en presencia de la cicloheximida no solo no aumenta la captación del aminoácido, sino que incluso la inhibe.

Es interesante que, del mismo modo como se describió para el transporte de la leucina [55], en las levaduras preincubadas con potasio se mantuvo el transporte de la citrulina durante los 60 minutos posteriores a la adición de la cicloheximida. Después de este tiempo, el transporte disminuyó lentamente en los siguientes 60 minutos (diamantes en la figura 9A).

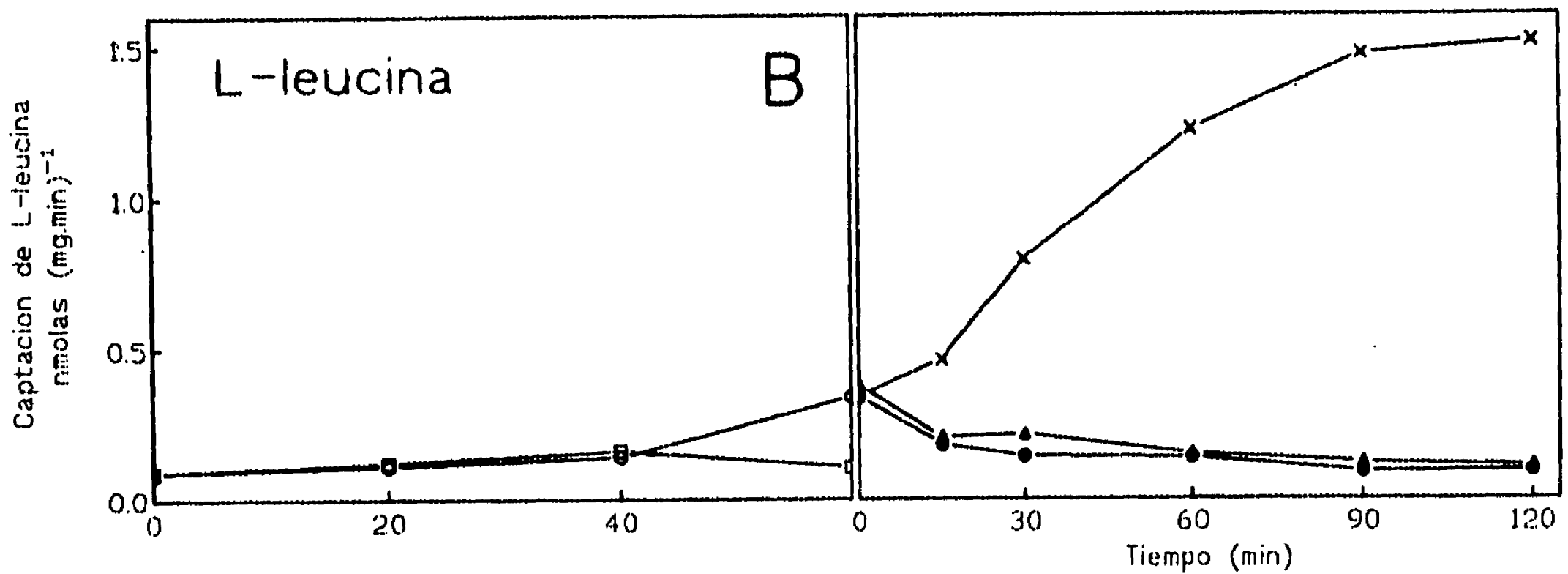
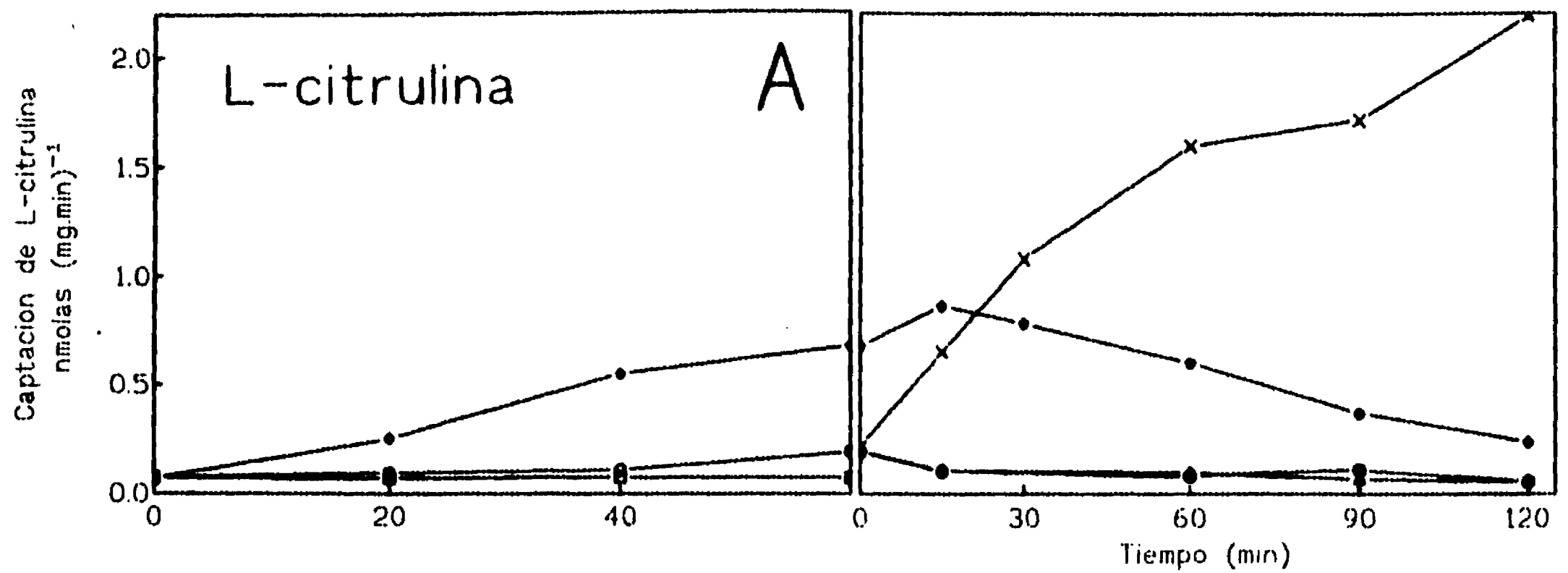


FIGURA 9. Inhibición de la actividad del transporte posterior a la adición de cicloheximida (Cy). Las células se preincubaron 60 minutos en presencia de glucosa (o), de glucosa más cicloheximida 100μM (□), o de KCl 10 mM (◆). Posteriormente, a las células preincubadas con glucosa se les adicionó Cy 100 μM (o); KCl 10 mM + Cy 100 μM (Δ); o KCl 10 mM (x). A las células preincubadas con KCl por 60 min se les adicionó Cy 100 μM (◆) y se siguió la captación del aminoácido como se describe en los métodos. **A.** Captación de L-citrulina 80 μM. **B.** Captación de L-leucina 200 μM.

1.4 Características cinéticas del transporte de la citrulina

La citrulina se transporta exclusivamente por la permeasa general de los aminoácidos; como se mencionó anteriormente, la importancia de determinar los efectos del potasio en este sistema de transporte, se debe a la posibilidad de determinar si estos efectos se realizan preferencialmente sobre esta permeasa. Con esta intención, se comparó la cinética del transporte de la citrulina en células preincubadas con glucosa con respecto a aquellas preincubadas con potasio. En la Figura 10, se observa que las células preincubadas con potasio, presentan un solo componente con constantes cinéticas de K_m , 125 y 103 μM y V_{max} , 3.57 y 3.47 $\text{nmolas mg}^{-1} \text{min}^{-1}$, obtenidas en dos experimentos separados. Un hecho notable es que en las levaduras preincubadas con glucosa, sólo fue posible observar una pequeña captación de la citrulina, independiente de las concentraciones del aminoácido utilizadas (gráfica de Michaelis-Menten en el recuadro de la figura 10).

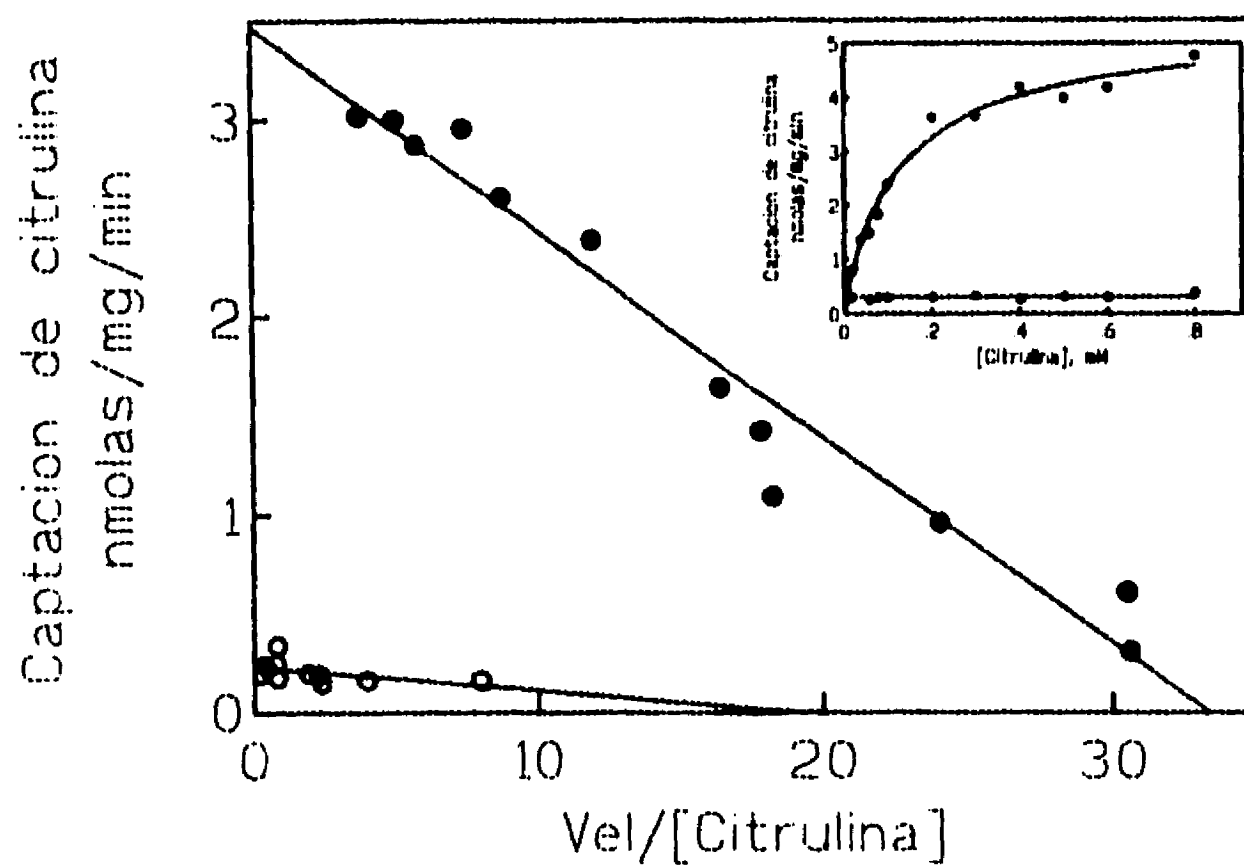


FIGURA 10. Gráfica de Eadie-Hofstee para la cinética de captación de la L-citrulina. Las células se incubaron 60 min en el medio control (o) o en presencia de KCl 10 mM (o). Posteriormente se lavaron y se resuspendieron en el medio control, se adicionaron diferentes concentraciones de L- ^{14}C citrulina, se incubaron 1 min y se filtró como se describió en los métodos.

1.5 Efecto del amonio en el transporte de la citrulina

Se ha descrito que la presencia o la adición de los iones amonio en el medio de incubación, inhibe la actividad de transporte de la citrulina y de otros aminoácidos que se transportan a través de la GAP1 [42]. En estudios anteriores, se observó que la adición del potasio junto con el amonio, conducía a una protección del transporte de la leucina de la inhibición producida por el amonio solo [55]. Con base en estos antecedentes, se decidió determinar si estos efectos se producían en la captación de la citrulina. En la Figura 11 se indica que la captación de este aminoácido se inhibe significativamente por el amonio; sin embargo, en las levaduras preincubadas en presencia de concentraciones equimolares de potasio y amonio, se obtuvo la misma, o una mayor protección de la inactivación producida por el amonio, que la observada para el transporte de la leucina [62].

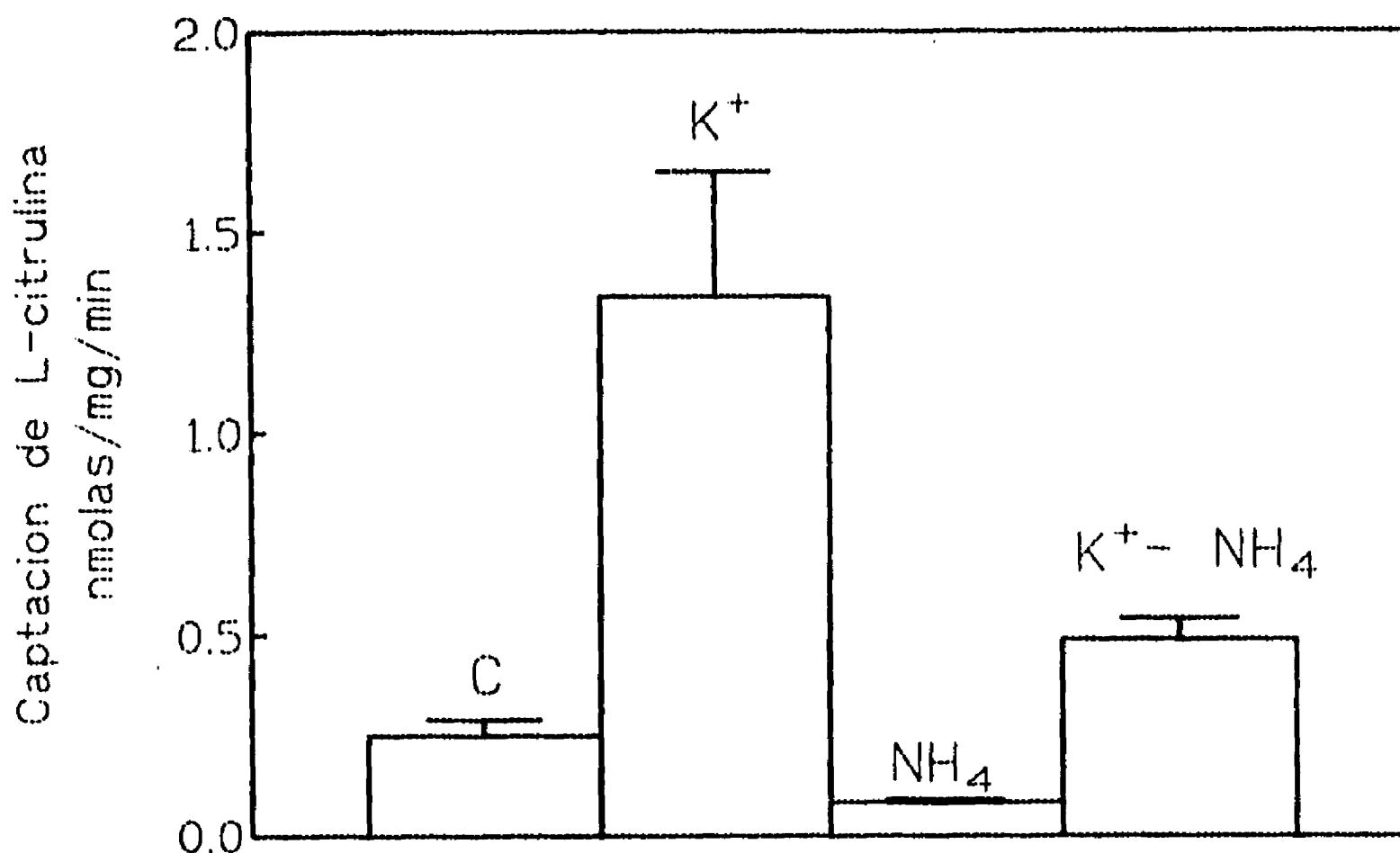


FIGURA 11. Captación de citrulina en levaduras preincubadas en presencia de potasio y/o de amonio. Las levaduras se preincubaron 60 min en el medio control más los cationes indicados. Posteriormente se realizó el ensayo de captación de la citrulina 80 μ M como se describió en los métodos. Control (C); KCl 10 mM (K⁺); NH₄Cl 10 mM (NH₄); concentraciones equimolares (10 mM) de KCl y NH₄Cl (K⁺-NH₄).

1.6 Transporte en las mutantes del mecanismo de inactivación-reactivación de la GAP1

Como se mencionó en la introducción, se ha descrito la participación de un grupo de proteínas citoplásmicas en la regulación de los sistemas de captación como la Permeasa General de los Aminoácidos (GAP1) [20,38,42]. Algunas de las proteínas están involucradas en la actividad del acarreador, es decir, en el mecanismo de inactivación-reactivación de las permeasas. Dentro de este grupo, se han aislado mutantes que carecen de la proteína reactivadora *npr1* y dobles mutantes *npr1,npi1* (que carecen de ambas proteínas reactivadora e inactivadora).

Con estos antecedentes, se decidió medir el transporte de la citrulina en dos de las levaduras que poseen las mutaciones mencionadas. En la Figura 12 se muestra el resultado de la captación de la citrulina en las dos mutantes. En la mutante que carece de la proteína *npr1*, la presencia del potasio no aumentó la captación del aminoácido a los mismos niveles que en las levaduras silvestres (figura 11), lo que sugiere que el potasio interactúa con esta proteína para aumentar la actividad de la permeasa GAP1. Por otro lado, la presencia de concentraciones equimolares de potasio y de amonio permite observar la misma actividad de transporte del aminoácido que la que se presenta en ausencia de los cationes.

En la doble mutante *npr1-npi1*, que carece de las proteínas que participan en el proceso de inactivación-reactivación, ninguno de los cationes monovalentes ejerce el efecto que se observó para las levaduras silvestres, es decir, ni el potasio aumenta la captación, ni el amonio la inhibe. Esto sugiere que el sitio común de acción para los dos iones, se encuentra en el mecanismo de inactivación-reactivación (NCI) de la GAP1. Otro aspecto interesante de esta mutante, es que posiblemente la ausencia de ambas proteínas, le permite a las levaduras mantener una captación alta del

aminoácido; es decir, al no existir el blanco para ninguno de los cationes (potasio y amonio) la actividad de la permeasa es constitutiva y por lo tanto no es afectada por ninguna condición de incubación.

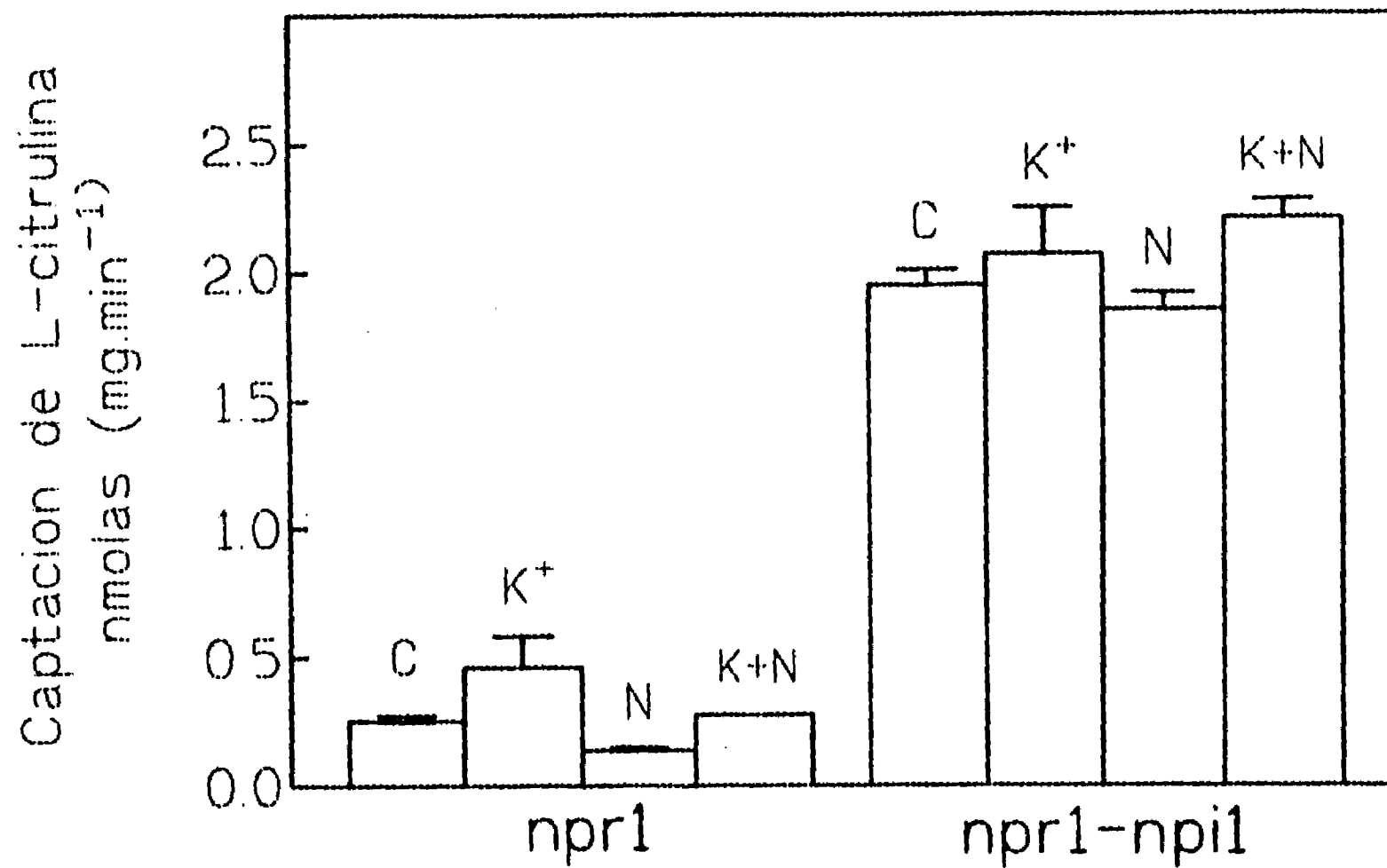


FIGURA 12. Transporte de L-citrulina en las mutantes del mecanismo de inactivación-reactivación de la GAP1. Las levaduras se preincubaron 60 minutos en presencia de glucosa (C); de KCl 10mM (K⁺); de NH₄Cl 10mM (N); o de concentraciones equimolares 10mM de KCl + NH₄Cl (K+N). Las condiciones experimentales fueron las mismas que se describen en la figura 11.

2. CINETICA DE COMPETENCIA METILAMINA / POTASIO

Considerando los efectos opuestos que producen ambos cationes monovalentes (potasio y amonio), se decidió estudiar si se establece algún tipo de inhibición para la captación de estos cationes.

Se ha descrito que este análogo del amonio se transporta a través de dos sistemas bien caracterizados: uno de alta afinidad y baja velocidad; y el otro de baja afinidad y alta velocidad [40]. Considerando que los sistemas de transporte para el amonio también se regulan por la fuente de nitrógeno, es decir, tanto su actividad, como su transcripción están sujetas a la inhibición por el amonio [63]; se decidió cultivar a las levaduras en presencia de una fuente de nitrógeno no represora, como la L-prolina, de manera que estos acarreadores están completamente activos. Además, las células se cosecharon en la fase exponencial de crecimiento (6 horas para la levadura silvestre XT300.3A) con el fin de reproducir los resultados descritos por Dubois y Grenson [40].

En la Figura 13, se ilustra la cinética de la metilamina, así como su inhibición en presencia de tres concentraciones de potasio. Como se observa, con las tres concentraciones de potasio utilizadas se obtienen inhibiciones de tipo mixto, en las que se afecta tanto la afinidad (K_m), como la velocidad máxima (V_{max}) de la metilamina. Sin embargo, estas inhibiciones no son muy grandes, comparadas con el control (Tabla 3).

Es importante señalar que las concentraciones de potasio utilizadas, se encuentran en el intervalo de los dos sistemas de captación descritos para este catión; el sistema de alta afinidad tiene una K_m de 24 μM , mientras que el de baja afinidad posee una K_m de 2 mM [50].

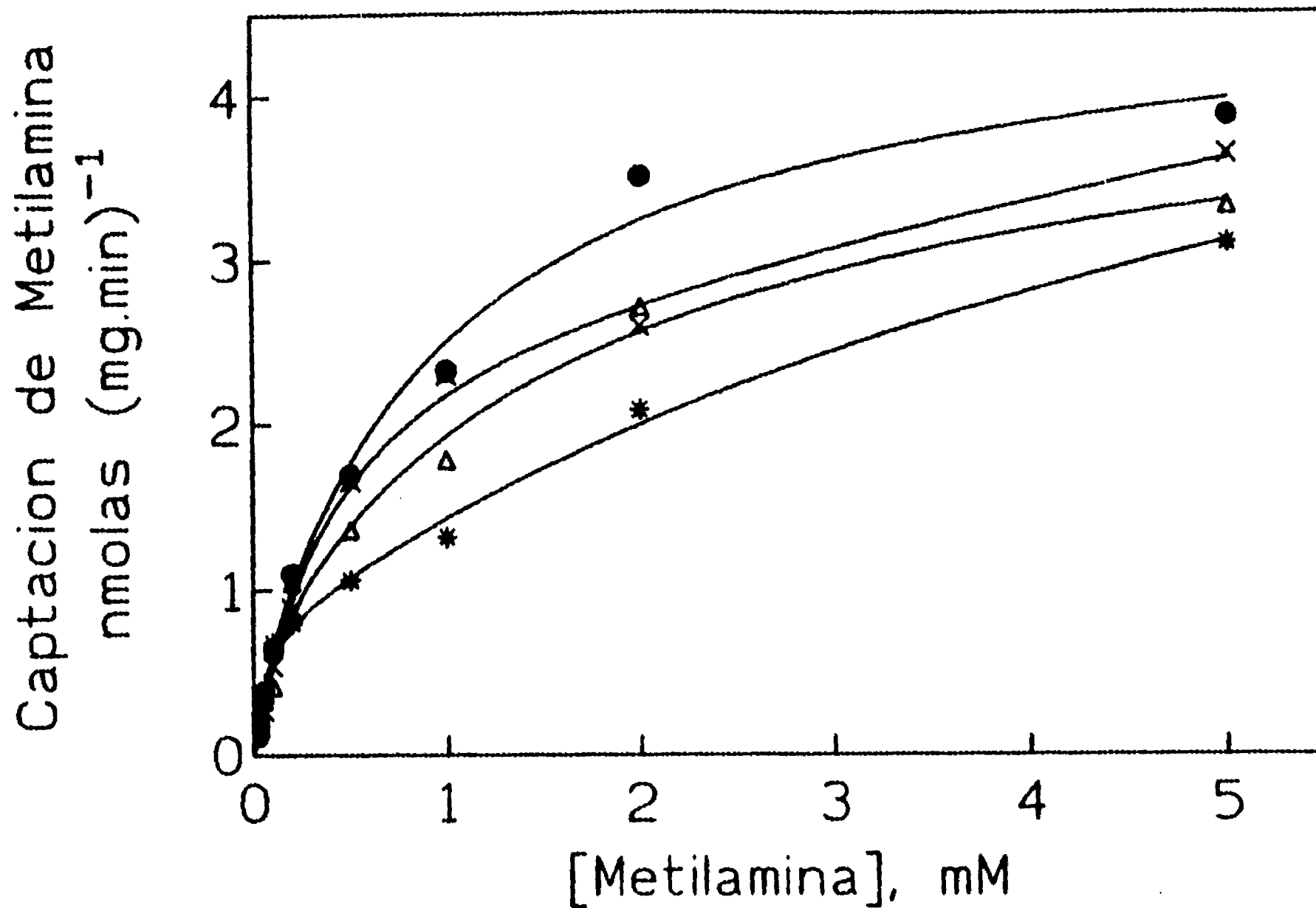


FIGURA 13. Cinética de competencia Metilamina / KCl. Las levaduras se preincubaron 60 min en el medio con prolina (1mg/ml), se lavaron y resuspendieron en el mismo medio. Se incubaron por 2 min y posteriormente se adicionaron diferentes concentraciones de ^{14}C -Metilamina (o) más KCl 0.2 mM (x); KCl 1 mM (Δ); o KCl 5 mM (*). Se incubó 1 min y se filtro como se indicó en los métodos.

TABLA 3. Constantes cinéticas de la inhibición del transporte de la metilamina por el potasio.

Parámetro	Control (o)	KCl (x) 0.2 mM	KCl (Δ) 1 mM	KCl (*) 5 mM	Ref [40]
Km1 (mM)	0.209	0.411	0.189	0.818	0.25
Vmax1** nmolas(mg.min) ⁻¹	0.736	2.45	1.24	2.49	20*
Km2 (mM)	1.028	3.85	2.896	4.36	2.0
Vmax2** nmolas(mg.min) ⁻¹	3.89	2.27	3.44	1.42	50*

Las constantes cinéticas Km1 y Vmax1, se refieren al sistema de alta afinidad y baja velocidad del transporte de la metilamina; mientras que las constantes Km2 y Vmax2, se refieren al de baja afinidad y alta velocidad.

* Los valores de Vmax se expresan como nmolas.mg de proteína. min.

** Los valores de Vmax en este trabajo se representan como nmolas (mg de células.min)⁻¹.

3. EFECTO DEL POTASIO EN LA TRANSCRIPCION DEL RNA MENSAJERO DE LA PERMEASA GENERAL DE LOS AMINOACIDOS (GAP1)

En estudios anteriores se encontró que la preincubación de las levaduras en presencia del potasio, conducía a un aumento en la síntesis total de las proteínas [16,55]; este resultado sólo se observó en las levaduras silvestres de la cepa XT300.3A y no en levaduras que carecen del sistema GAP1 [55], por lo que se concluyó que esta permeasa podía activarse o sintetizarse preferencialmente por el potasio.

Con este antecedente, se pensó que el potasio podía ejercer su efecto a nivel de un incremento en la transcripción del mensajero de la GAP1.

Para determinar esta posibilidad, se realizó un análisis de tipo Northern Blot. Se obtuvo RNA total de la levadura silvestre XT300.3A cultivada en un medio con amonio como fuente de nitrógeno. Previamente, las levaduras se preincubaron durante 60 minutos en presencia de glucosa 150 mM más: KCl 10mM; NH₄Cl 10mM o concentraciones equimolares de KCl más NH₄Cl 10 mM. Se usó como sonda el fragmento de 0.9 Kb que se obtuvo del gene que codifica para la GAP1. Se usaron 3 concentraciones del RNA total purificado: 5, 10 y 20 µg, con el fin de determinar cuál de ellas producía una banda más definida.

En la Figura 14 se muestra que en las levaduras preincubadas en presencia de amonio, la banda correspondiente al RNA mensajero de la GAP1 no se observa, resultado que concuerda con los descritos en la literatura [32]. Sin embargo, la preincubación con el potasio solo, no parece aumentar el nivel del mensajero. Por otro lado, la preincubación con potasio más amonio, permite obtener el mensajero de la GAP1 a pesar de la presencia del amonio.

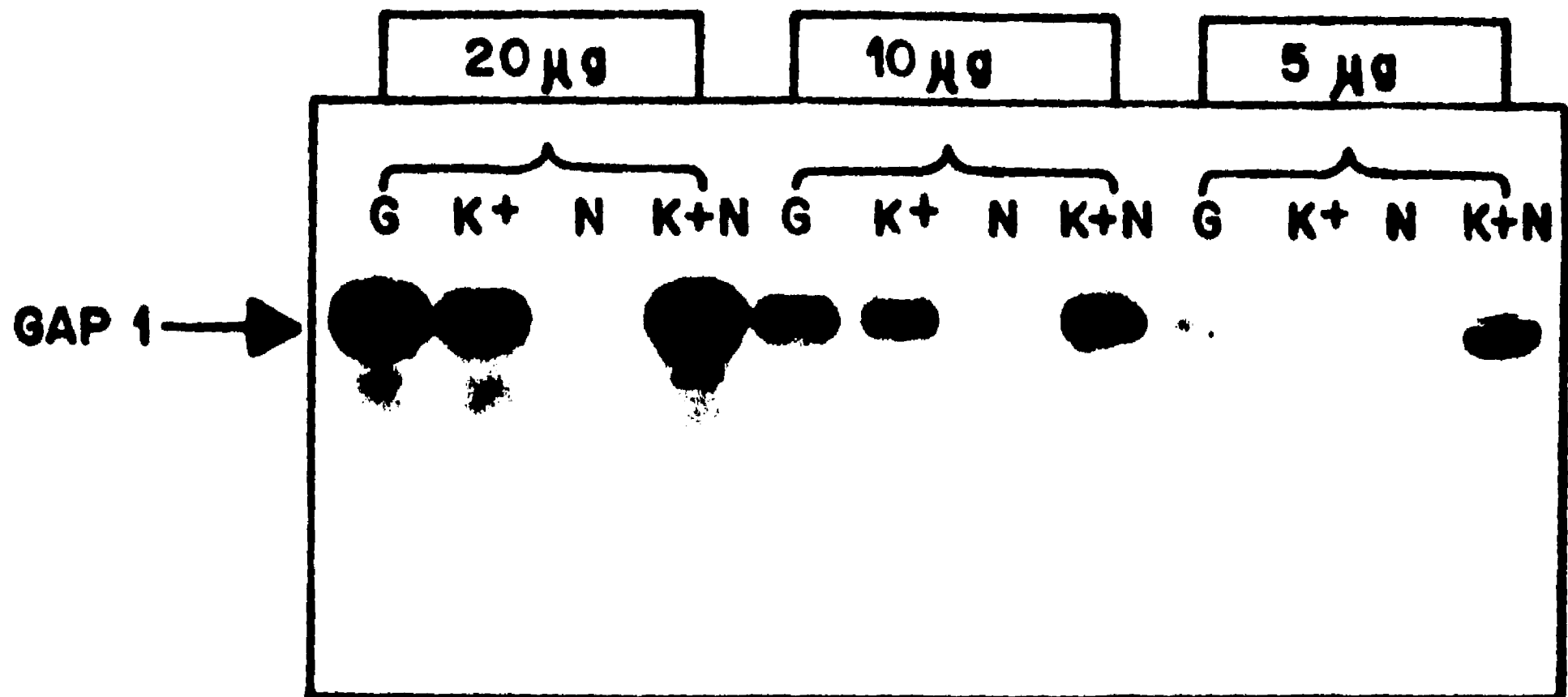


FIGURA 14. Efectos del potasio y el amonio en la expresión de la GAP1. Las células se preincubaron 60 minutos en presencia de glucosa (G); KCl 10 mM (K^+); NH_4Cl 10 mM (N); y concentraciones equimolares de KCl + NH_4Cl 10 mM (K+N). Las concentraciones de RNA total utilizadas fueron 5, 10 y 20 μ g. La banda correspondiente a la GAP1 mide 2.2 Kb.

Se decidió realizar estos experimentos en levaduras preincubadas durante diferentes tiempos, para determinar si era un efecto que dependía del tiempo de preincubación; conjuntamente se utilizó una sonda de actina como control interno de la concentración del RNA; el gene de la actina es constitutivo y no se regula por la fuente de nitrógeno. Las levaduras se preincubaron durante 20, 40 y 60 minutos en el medio control más las condiciones anteriores. Las dos sondas descritas se adicionaron al mismo tiempo con el objeto de reproducir los resultados.

Como se indica en la Figura 15, el RNA mensajero de la GAP1 se observó en todos los tiempos de preincubación. Es claro que no hubo un aumento considerable en la banda que corresponde a las células preincubadas en presencia del potasio, por lo que se realizó un análisis densitométrico de las bandas obtenidas en las autoradiografías (Tabla 4).

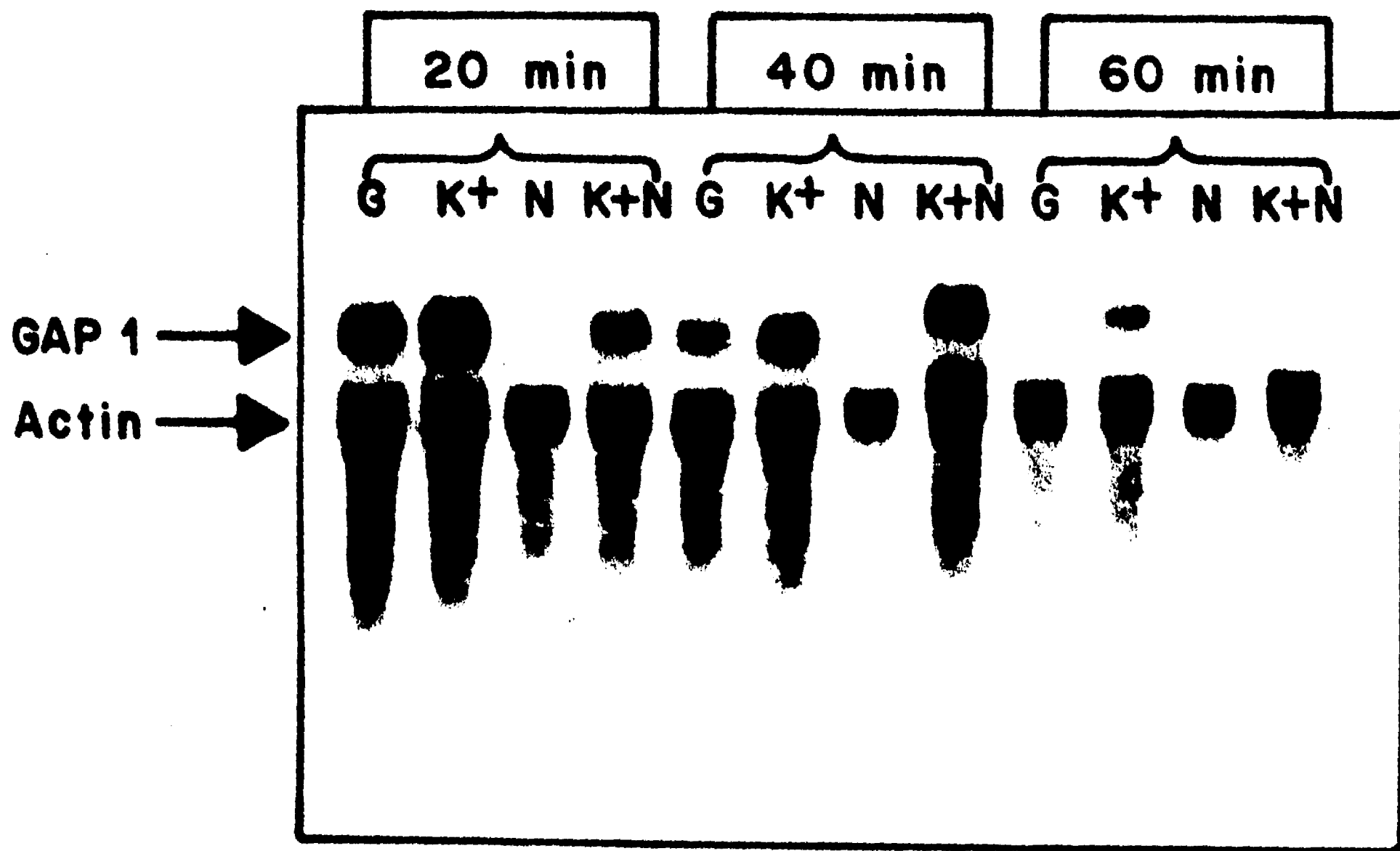


FIGURA 15. Expresión de la GAP1 con respecto al tiempo de preincubación. Las levaduras se preincubaron por diferentes tiempos (20, 40 y 60 minutos) en las mismas condiciones descritas en la figura anterior. Se utilizó la sonda de actina como control interno de la concentración del RNA total.

TABLA 4. Análisis densitométrico del RNA mensajero de la GAP1

Incubación	% de RNAm de GAP1*	% de Aumento de GAP1 **
20 minutos		
C	27.1	100
K ⁺	35.7	131.7
NH ₄ ⁺	0.0	0.0
K+N	27.3	100
40 minutos		
C	20.5	100
K ⁺	32.2	157
NH ₄ ⁺	0.0	0.0
K+N	22.9	111.1
60 minutos		
C	15.5	100
K ⁺	20.3	130.9
NH ₄ ⁺	0.0	0.0
K+N	12.2	79.0

* Los porcentajes del RNA mensajero se normalizaron con respecto al control interno de la actina.

** El aumento en la banda de la GAP1 se calculó en función al control de glucosa

Estos resultados indican que el potasio tiene un efecto discreto en la transcripción del mensajero de la GAP1, sin embargo, es muy interesante que el potasio impide la inhibición, producida por el amonio, de la expresión de este mensajero.

V DISCUSION

Uno de los mecanismos de regulación más interesantes en las levaduras, es el que se realiza en las permeasas o sistemas de transporte de los aminoácidos. El hecho de que estos organismos posean una gran cantidad de acarreadores que pueden transportar a un sustrato determinado implica una dificultad en el estudio de las características, no sólo cinéticas, sino funcionales de los mismos. Por otra parte, y como consecuencia de que las levaduras estén sujetas a medios ambientes variables, introduce un nivel separado de regulación relacionado con la fuente de nitrógeno que se encuentre en el medio [4].

Los transportadores de aminoácidos sensibles a la Represión Catabólica Nitrogenada (NCR) así como los transportadores de otros compuestos nitrogenados, se integran en diversos circuitos de regulación, sean éstos específicos o generales, que controlan los procesos catabólicos en estos organismos [20]. Aunado a lo anterior, los transportadores de los aminoácidos se regulan por un mecanismo adicional que inactiva y reactiva a las permeasas de acuerdo con la disponibilidad del nitrógeno. Esta regulación, denominada Inactivación Catabólica Nitrogenada (NCI) es afectada por diversas proteínas, y parece implicar modificaciones covalentes de las permeasas y/o de las proteínas reguladoras [1,20].

La Permeasa General de los Aminoácidos (GAP1) de las levaduras, se ha considerado un modelo interesante para estudiar la regulación de las permeasas sensibles a la NCR. Este sistema de transporte se inhibe tanto a nivel de su actividad

de captación, como a nivel de su expresión, cuando las levaduras se encuentran en un medio con una fuente rica o abundante de nitrógeno, como la glutamina, la asparagina, o el amonio [27,32,38]. Tiene además la ventaja de que, no obstante ser inespecífica, esta permeasa puede estudiarse con la citrulina, que sólo ella transporta.

Con los antecedentes anteriores, es importante señalar que en este estudio las levaduras se cultivaron en un medio que contiene amonio como única fuente de nitrógeno; de ésta manera las células no poseen una GAP1 activa, además de que su expresión también se encuentra inhibida. La ventaja de partir de un cultivo en estas condiciones es que permite estudiar la actividad y la expresión de esta permeasa en diferentes medios de incubación. El único requisito, es el de preincubar a las levaduras en presencia de una fuente de energía metabólica como la glucosa, para inducir la activación y la síntesis de los diversos sistemas que no estén activos [4,16].

En los antecedentes se mencionó que el potasio parece estar involucrado en la regulación de los sistemas de transporte de los aminoácidos. Otro aspecto importante del que se debe hacer mención es que los resultados que se obtuvieron tanto en estudios previos [55], como en el presente trabajo [62], parecen ser consecuencia del efecto del potasio durante la preincubación (dado que este catión se acumula de manera importante en las células), y no de un efecto asociado directamente con la captación, pues el potasio fue retirado del medio durante el transporte de los aminoácidos, o durante la purificación del RNA total de las levaduras. De hecho, el potasio agregado simultáneamente con el aminoácido, inhibe el transporte de este último [11].

La elección de estudiar la relación entre los efectos del potasio y del amonio en el transporte de la citrulina, se fundamenta en el hecho de que este aminoácido es

transportado únicamente a través de la GAP1, lo que proporciona una manera de asegurar que cualquier resultado obtenido sólo se relacione con esta permeasa.

La presencia del potasio en el medio de preincubación aumenta la captación de la citrulina; este aumento se observó aún a concentraciones muy bajas del catión (desde 250 μM), lo que implica que el potasio debió ser transportado al interior de las células (figura 6). En estudios previos [55] se describió que el potasio es acumulado en las células (aproximadamente en un 60 %), lo que establece una relación entre su acumulación y la aceleración en el transporte de los aminoácidos.

Otro aspecto interesante es, que del mismo modo como se observó en el transporte de la leucina, la activación de la GAP1 es dependiente del tiempo de preincubación, tanto en presencia de glucosa, como de potasio (figura 7). Sin embargo, la captación de la citrulina es aún mayor en las células preincubadas con potasio. De lo anterior, parece obvio que se requiere de un periodo de incubación en presencia de una fuente de energía metabólica, además del potasio, para observar actividad de captación del aminoácido; aunado a esto, es posible observar un aumento en la síntesis de proteínas cuando se midió la incorporación de la marca de la citrulina a la síntesis de proteínas totales (figura 8). Cabe mencionar que aunque la citrulina no es un aminoácido de las proteínas, es un intermediario para la síntesis de la arginina, por lo que su incorporación a la síntesis de proteínas totales debe realizarse al ser convertida en arginina, que es un aminoácido constituyente de las proteínas.

Considerando que se requiere de un periodo de incubación prolongado, en presencia de glucosa o de potasio, para observar la aceleración del transporte y para alcanzar un aumento en la síntesis, es factible proponer un efecto del potasio relacionado con la síntesis de los acarreadores, es decir, con un aumento en el número

de permeasas presentes en las células. Además, como fue posible demostrar un mayor aumento en la síntesis de las proteínas, en función del tiempo, cuando las células fueron preincubadas en presencia de potasio, comparado con las de glucosa, es posible que la acumulación del potasio durante la preincubación, sea la responsable del aumento de la velocidad de síntesis del acarreador.

En este sentido, si la síntesis de las proteínas se interrumpe por la adición de un inhibidor, como la cicloheximida (cuando los acarreadores se encuentran completamente expresados y activos, es decir, después de un tiempo de incubación determinado en presencia de la glucosa y/o del potasio), la síntesis de las proteínas se detiene independientemente de si las levaduras fueron o no preincubadas con potasio; sin embargo, el transporte se mantiene por más tiempo en las células preincubadas con potasio (figura 9A). Por otro lado, es posible que la degradación más lenta del transportador pueda deberse a que el potasio protege directamente a estos sistemas de la degradación, o a que al existir más moléculas acarreadoras, la degradación sea más lenta.

Ahora bien, en condiciones en las que el sistema GAP1 se encuentra activo (después de incubar a las células durante 60 minutos con glucosa), la adición de la cicloheximida junto con el potasio conduce a una disminución en la captación de la citrulina; esto indica que una vez que se detiene la síntesis de las proteínas, el potasio no es capaz de aumentar el transporte, es decir, no puede aumentar la actividad de la permeasa, al contrario se ha descrito que el potasio agregado al mismo tiempo que el aminoácido, inhibe su transporte [11]. Sin embargo, la adición del catión en las levaduras preincubadas con glucosa, produce un aumento muy notable en la captación, lo cual confirma la hipótesis de que la preincubación en presencia del potasio, aumenta la síntesis *de novo* de las proteínas acarreadoras.

Es importante señalar que estos resultados también se pueden observar en el transporte de la leucina (figura 9B). El aumento en la actividad del transporte y de la síntesis de proteínas, al estudiar el transporte de la leucina, se realiza preferencialmente a través de la GAP1, puesto que en levaduras que carecen de esta permeasa, el potasio no produce ningún efecto ni en la actividad de transporte de la leucina, ni en la síntesis de las proteínas [62]. De lo anterior, y dada la semejanza en los resultados obtenidos al inhibir la actividad de transporte de ambos aminoácidos, es razonable concluir que el aumento en la captación puede adjudicarse a que el potasio aumenta la síntesis *de novo* de la GAP1, que como se mencionó antes, puede mediar el transporte de estos dos aminoácidos.

El aumento en la actividad de la GAP1 se observó en el transporte de la citrulina. Uno de los datos más sorprendentes, es que esta permeasa casi no parece estar activa a menos que el potasio se encuentre presente durante la preincubación, lo cual nuevamente parece indicar que la acumulación del catión pudiera estimular la síntesis de este acarreador. Al comparar la cinética del transporte de la citrulina en levaduras preincubadas en presencia de potasio y las preincubadas sólo con glucosa (figura 10), se observó un componente cinético con valores de K_m y V_{max} bien definidos; sin embargo, en las células preincubadas con glucosa, la captación de la citrulina fue tan pequeña, que no es posible determinar ningún parámetro cinético al no existir ninguna relación entre la velocidad de captación y las concentraciones de citrulina utilizadas para medir su cinética [62]. Esto no supone que las levaduras no sean capaces de transportar a este aminoácido aún cuando la GAP1 se encuentre activa, sino más bien implica que el potasio, al aumentar la síntesis de los acarreadores, es la permeasa general la que puede transportar con mayor eficacia a este aminoácido.

Cuando las levaduras se cultivan en presencia de amonio como fuente de nitrógeno, tanto la actividad, como la expresión de la GAP1 se inhiben [38]; sin embargo, es posible liberar esta inhibición al preincubar a las células en presencia de una fuente de energía metabólica como la glucosa [16], e incluso incrementar su síntesis cuando existe potasio durante la preincubación [55,62] (figura 11). Grenson [38], describió que la inhibición por el amonio se produce por un proceso de inactivación de las permeasas, al desplazar el equilibrio en favor de las proteínas inactivadoras Npi's, las cuales afectan la actividad de captación de la GAP1. Por otro lado, Horák y cols. [64], demostraron que la inactivación de los sistemas de transporte de los aminoácidos producidos por el amonio, se libera si se induce la síntesis *de novo* de las proteínas acarreadoras. Estos datos apoyan los resultados de este trabajo en relación con la importancia de la síntesis de los transportadores para su actividad y además resaltan el efecto del potasio, es decir, que al conducir a un aumento en la síntesis de los acarreadores disminuye o elimina el efecto de la inactivación de los mismos por el amonio. De aquí se comprende que la presencia del potasio en el medio proteja a los transportadores tanto de la inactivación, como de su degradación.

Hein y André [65], describieron que la GAP1 se degrada durante la inactivación catabólica nitrogenada y demostraron que esta degradación proteolítica requiere de la presencia del producto del gene NPI1. Considerando lo anterior, es interesante que en una levadura que posee mutaciones en los genes NPR1 (proteína reactivadora) y NPI1 (proteína inactivadora), o sea, que carece de las proteínas que participan en el mecanismo de inactivación-reactivación, ninguno de los dos cationes (potasio y amonio), produce el efecto característico que se observó en las levaduras silvestres; es decir, no hay un aumento de la captación en las células preincubadas con el potasio, y tampoco hay una inhibición del transporte debida a la presencia del amonio (figura 13).

Esto sugiere una estrecha relación entre los efectos producidos por el potasio y el amonio, implicando un sitio común para estos dos cationes; probablemente este blanco de acción sea el mecanismo de inactivación-reactivación de la GAP1.

Lo anterior se fundamenta en el hecho de que en las mutantes que no poseen la proteína reactivadora Npr1, el potasio no aumentó la captación de la citrulina en los mismos niveles que en las levaduras silvestres. Esto sugiere fuertemente, que de alguna manera, el potasio interactúa con esta proteína conduciendo a un aumento en la actividad de la permeasa GAP1 presente en la membrana plasmática de las levaduras. Parece ser que el eliminar el mecanismo de inactivación-reactivación, le permite a las células mantener una actividad de captación de los aminoácidos muy alta, independientemente de la presencia del potasio y/o del amonio, lo cual confirma aun más la participación de ambos cationes en el mecanismo de inactivación-reactivación.

Es posible que el potasio desplace el equilibrio en favor de la proteína reactivadora Npr1, lo que explicaría el transporte tan alto de los aminoácidos. En estas condiciones, el potasio no sólo le permite a la GAP1 encontrarse en un estado funcional y activo, sino que además la protege de la degradación por el amonio.

Los resultados de la inhibición de la síntesis de las proteínas por la adición de la cicloheximida, también confirman una observación anterior [55], en la cual se encontró que la adición de la cicloheximida en levaduras que carecen de la GAP1, la captación de la leucina (que en esta mutante se transporta por dos sistemas específicos) se mantuvo por más tiempo, de manera similar a las levaduras preincubadas con potasio. Lo anterior indicó que la permeasa que debía ser degradada más rápidamente era la GAP1, resultado que se confirma con los datos de la figura

9. Es importante mencionar que una mayor degradación de la GAP1 no sería extraña, considerando que es un sistema inducible que está sujeto al estado metabólico en el que se encuentren las levaduras y en particular a la síntesis activa de nuevas proteínas.

De acuerdo con los resultados de Hein y André [65], que demuestran que mutaciones en el extremo carboxilo terminal de la GAP1 confieren resistencia a la inactivación y a la degradación de la permeasa, y por lo tanto eliminan el blanco de las Npi's [31]; es posible que el potasio, al conducir a un aumento en la síntesis de esta permeasa e interactuar con la proteína Npr1, esté protegiendo a la GAP1 impidiendo que se degrade y permanezca activa.

Ahora bien, de los datos obtenidos en la cinética de competencia de la metilamina por el potasio, (Figura 13), se puede determinar que efectivamente, en las levaduras de la cepa XT300.3A, también existen 2 sistemas que median la captación del amonio. La adición de las diferentes concentraciones de potasio utilizadas, que se encuentran dentro de los valores de sus constantes de afinidad, producen una inhibición compleja en la captación de la metilamina. Esta inhibición parece corresponder a las de tipo mixto, en las que tanto la afinidad, como las velocidades máximas son afectadas. Sin embargo, es claro que la inhibición producida no es muy alta.

Se describió que la metilamina se utiliza como un análogo del amonio, al no existir un isótopo radiactivo de este catión [40,53]; de la misma manera, el transporte del potasio se suele medir usando al rubidio ($^{86}\text{Rb}^+$) como análogo del potasio [47-50]. La captación de ambos análogos (metilamina y rubidio), se inhibe de manera competitiva por los sustratos naturales, es decir, el amonio y el potasio respectivamente; sin embargo, los datos descritos por Peña y cols. [49], Roon y cols.

[53] y Marini y cols. [63], demuestran que, por un lado, el amonio produce una pequeña inhibición no competitiva del transporte del rubidio; y por el otro, que el potasio y otros cationes monovalentes, no producen una inhibición importante del transporte de la metilamina. De hecho, estos grupos de investigación demuestran que ambos cationes monovalentes (el potasio y el amonio), son transportados a través de diferentes acarreadores. Por otra parte, lo importante es que el potasio no parece aumentar el transporte de los aminoácidos por bloquear de manera significativa el transporte del amonio.

Dada la complejidad observada en la cinética de competencia, no se pueden descartar efectos secundarios producidos por variaciones en el potencial de la membrana, o en la carga de la superficie de las levaduras, que pudieran producirse por la presencia de estos cationes, en particular a las concentraciones más altas que se utilizaron.

Se mencionó antes que en las levaduras *Saccharomyces cerevisiae*, tanto la síntesis, como la actividad de la GAP1 se regula de acuerdo a las fuentes de nitrógeno disponibles en el medio de cultivo [20]. La síntesis de esta permeasa se reprime en presencia de una fuente rica de nitrógeno, como los iones amonio, y la permeasa preexistente es rápida y completamente inactivada [38]. Considerando que la preincubación en presencia de potasio, aumentó la actividad y la síntesis de la GAP1, se estudió la expresión del mensajero de esta permeasa en diversas condiciones de preincubación, con el objeto de determinar si el potasio pudiera aumentar la transcripción de este mensajero (figs. 14 y 15).

Un efecto del potasio que es constante, es que su presencia junto con el amonio, permite que la permeasa se encuentre activa y además que el RNA mensajero de la GAP1 no se inhiba por el amonio. Esto indica que el potasio efectivamente participa en la regulación de estos sistemas de transporte, pues se encuentra implicado en los

dos mecanismos de regulación más importantes que involucran a otro catión monovalente como el amonio.

Es muy interesante que el mensajero de esta permeasa se exprese desde tiempos de incubación cortos (20 minutos), únicamente cuando las levaduras se preincuban con una fuente de energía que les permite activar e iniciar la síntesis de las proteínas que son afectadas durante su crecimiento en un medio con amonio como fuente de nitrógeno. Llama la atención el hecho de que desde este tiempo de incubación, el amonio elimina completamente al mensajero de la GAP1, pero no inhibe completamente el transporte; sin embargo, en presencia del potasio en el mismo periodo, la banda de la GAP1 se encuentra presente y la actividad del transportador es mayor que en las levaduras preincubadas con glucosa.

Es notable que el potasio protege al mensajero GAP1 de la represión por el amonio; se debe señalar que esta protección (y la observada en el transporte) requiere de la presencia continua del potasio en el medio de incubación, así como de su transporte y acumulación en las células (si el potasio se remueve del medio, la adición del amonio conduce a un decaimiento en la actividad de transporte [55,62]). En este sentido, la protección observada en la expresión del mensajero de la GAP1 sugiere que en esta vía de regulación debe existir alguna(s) proteína que participa(n) en este mecanismo, que sean afectadas por el potasio.

Por otro lado, no se obtuvo un aumento muy grande en la cantidad del mensajero de GAP1 en las levaduras preincubadas con potasio. Se esperaba que un aumento en este mensajero conduciría a un aumento en su síntesis y por lo tanto a un aumento en la actividad de la permeasa. Es posible que el potasio, al proteger a este mensajero de la inhibición por el amonio, conduzca a una mayor estabilidad del mismo, que pudiera permitirle producir una proteína con una alta actividad de captación.

El objetivo principal de este trabajo era definir el nivel en el que el potasio ejercía su efecto. Los antecedentes que se tenían apuntaban a discernir entre dos posibilidades, a saber, ¿el potasio aumenta la actividad o la síntesis de la GAP1?

La captación de la citrulina, que se realiza únicamente a través de la GAP1, se incrementa cuando las levaduras se preincubaron en presencia del potasio. No sólo su actividad aumenta, sino que su incorporación a la síntesis de proteínas totales es mayor en estas condiciones. Así mismo, cuando las levaduras poseen una GAP1 activa, la adición del potasio aumenta de manera importante su actividad, lo cual no sucede si la síntesis de proteínas se detiene por la adición de la cicloheximida; esto conduce a la conclusión de que el potasio induce la síntesis *de novo* de esta proteína y por lo tanto aumenta su capacidad de captación.

Paralelamente, al desplazar el equilibrio en favor de la proteína reactivadora Npr1, y por lo tanto interfiriendo con la actividad de las proteínas Npi's, el potasio protege a la GAP1 de la inactivación y su posterior degradación producida por el amonio. A pesar de que la preincubación en presencia del potasio no conduce a un incremento en la cantidad del mensajero de la GAP1, el hecho de que lo proteja de la represión por el amonio, le permite producir una permeasa activa que transporta a los aminoácidos de manera eficaz. Se debe señalar que el transporte de la citrulina, parece requerir de la acumulación del potasio para estimular la síntesis de la GAP1, disminuir su degradación y por lo tanto aumentar su actividad. Es necesario enfatizar que la preincubación con 5 ó 10 mM de potasio produce un aumento bastante grande de su concentración dentro de la levadura (aproximadamente hasta 330 mM) [62] y no cambios pequeños en ésta, como pudieran sugerir las concentraciones relativamente bajas que se requiere adicionar fuera.

VI CONCLUSIONES

- ♪ El potasio participa en el mecanismo de Inactivación Catabólica Nitrogenada (NCI) de la Permeasa General de los Aminoácidos (GAP1), desplazando el equilibrio entre los sistemas activador-inactivador (Npr1-Npi's) en favor del activador.

- ♪ El potasio también participa en el mecanismo de Represión Catabólica Nitrogenada (NCR), al proteger al RNA mensajero de la Permeasa General de los Aminoácidos (GAP1) contra el efecto represor del amonio.

- ♪ El potasio aumenta la actividad de la Permeasa General de los Aminoácidos, y conduce a un incremento adicional en la síntesis *de novo* de este acarreador.

- ♪ El potasio protege a los sistemas de transporte sensibles a la NCR, aparentemente compitiendo con el amonio por un sitio de acción común, que parece ser el mecanismo de inactivación-reactivación de la GAP1.

VII PERSPECTIVAS

Hasta este momento, el estudio de los efectos del potasio en el transporte de los aminoácidos, ha demostrado la participación que tiene la acumulación de este catión monovalente en distintos niveles de la regulación de estos sistemas de captación.

No obstante, la comprensión del funcionamiento de estos sistemas requiere definir si el potasio afecta de manera preferente alguno de estos mecanismos de regulación.

Para comprobar inequívocamente la relación del potasio con la inducción de la síntesis *de novo* de la GAP1 o de otras permeasas de los aminoácidos, sería interesante producir anticuerpos específicos que reconozcan a estos acarreadores. De hecho, durante este estudio se intentó producirlos; desafortunadamente resulta difícil generar anticuerpos contra una proteína de la cual sólo se posee la secuencia de nucleótidos. Al mismo tiempo, la gran similitud en las secuencias de estos sistemas acarreadores conduce a otro problema: elegir un segmento de la proteína que sea diferente de las otras, además de estar expuesto y ser lo suficientemente grande para reconocer a la proteína en una preparación de membranas plasmáticas.

No obstante estos problemas, fue posible producir anticuerpos que aunque no producían una señal muy clara, indican que con un diseño más cuidadoso del péptido apropiado, es posible generarlos. De esta manera, se podría disipar la duda de si el potasio aumenta la cantidad de acarreadores en la membrana de estas levaduras.

Otro aspecto que puede estudiarse es la participación de otras proteínas en el mecanismo de inactivación-reactivación de estas permeasas. Al respecto, se encontraron evidencias que apuntan a un efecto del potasio en la actividad de la proteína reactivadora Npr1.

Se tiene la fortuna de sostener una colaboración con el grupo de la Universidad Libre de Bruselas en Bélgica; esto permitiría obtener los genes y las mutantes que están relacionadas con esta regulación. Estudiar los efectos de la preincubación en presencia del potasio y/o del amonio en la captación de los aminoácidos de estas mutantes y en la expresión de los genes correspondientes, permitiría determinar si efectivamente el potasio bloquea o favorece la actividad de estas proteínas. Nuevamente, en este trabajo se estudiaron los efectos del potasio en el transporte de algunas de las mutantes; sin embargo, no se contaba con una mutante simple que careciera de la proteína inactivadora Npi, por lo que no fue posible comparar con la que no posee la proteína reactivadora Npr1. Determinar un efecto directo del potasio en una de las proteínas de este mecanismo, permitiría elaborar un esquema más claro de su funcionamiento y regulación.

Por otro lado, la participación del potasio en la protección de la transcripción de la GAP1 contra los efectos del amonio, sugiere un posible efecto en la estabilidad del RNA mensajero de esta permeasa; sería interesante estudiar la estabilidad y la síntesis de este mensajero bajo las diferentes condiciones de preincubación de las levaduras. También se pueden realizar estos estudios en la expresión de los genes de otras permeasas que se regulan por la fuente de nitrógeno, como la de prolina o la de GABA y compararlos con algunas permeasas que no estén sujetas a este tipo de regulación, como las constitutivas.

XIII REFERENCIAS

1. **Wiame, J-M., Grenson, M. y Arst, H.N.** 1985. Nitrogen catabolite repression in yeast and filamentous fungi. *Adv. Microbial. Physiol.* 26, 1-87.
2. **Cooper, T.G.** 1982. Transport in *Saccharomyces cerevisiae*. pp. 399-461. In *The Molecular Biology of the Yeast Saccharomyces: Metabolism and Gene Expression*. (Strathern, J.N., Jones, E.W. y Broach, J.R. eds.) Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y.
3. **Large, P.J.** 1986. Degradation of Organic Nitrogen Compounds by Yeast. *YEAST* 2, 1-34.
4. **Horák, J.** 1986. Amino acid transport in eucaryotic microorganisms. *Biochim. Biophys. Acta* 864(2), 223-256.
5. **Mitchell, P.** 1961. Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by chemiosmotic type mechanism. *Nature* 191, 144-148.
6. **Goffeau, A. y Slayman, C.W.** 1981. The proton-translocating ATPase of the fungal plasma membrane. *Biochim. Biophys. Acta* 639, 197-223.
7. **Eddy, A.A., Indge, K.J., Backen, K. y Nowackci, J.A.** 1970. Interactions between potassium ions and glycine transport in the yeast *Saccharomyces carlsbergensis*. *Biochem. J.* 120, 845-852.
8. **Peña, A.** 1973. Studies with guanidines on the mechanism of K^+ transport in yeast. *FEBS LETTERS* 34(1), 117-119.
9. **Peña, A. y Ramírez, G.** 1975. Interaction of ethidium bromide with the transport system for monovalent cations in yeast. *J. Memb. Biol.* 22, 369-384.
10. **Peña, A.** 1975. Studies on the mechanism of K^+ transport in yeast. *Arch. Biochem. Biophys.* 167, 397-409.
11. **Eddy, A.A., Backen, K. y Watson, G.** 1970. The concentration of amino acids by yeast cells depleted of adenosine triphosphate. *Biochem. J.* 120, 853-858.
12. **Eddy, A.A. y Nowacki, J.A.** 1971. Stoicheiometrical proton and potassium ion movements accompanying the absorption of amino acids by the yeast

Saccharomyces carlsbergensis. Biochem. J. 122, 701-711.

13. **Ballarin-Denti, A., Den Hollander, J.A., Sanders, D., Slayman, C.W. y Slayman, C.L.** 1984. Kinetics and pH-dependence of glycine-proton symport in *Saccharomyces cerevisiae*. Biochim. Biophys. Acta 778, 1-16.
14. **Eddy, A.A.** 1982. Mechanisms of Solute Transport in Selected Eukaryotic Micro-Organisms. Adv. Microbiol. Physiol. 23, 1-78.
15. **Ramos, E.H., De Bongioanni, L.C. y Stoppani, A.O.M.** 1980. Kinetics of the L-[¹⁴C]leucine transport in *Saccharomyces cerevisiae*: Effect of energy coupling inhibitors. Biochim. Biophys. Acta 599, 214-231.
16. **Kotyk, A., Horák, J. y Knotková, A.** 1982. Transport protein synthesis in non-growing yeast cells. Biochim. Biophys. Acta 698, 243-251.
17. **Kotyk, A. y Ríhová, L.** 1972. Energy requirement for amino acid uptake in *Saccharomyces cerevisiae*. Folia Microbiol. 17, 353-356.
18. **Horák, J., Ríhová, L. y Kotyk, A.** 1981. Energization of sulfate transport in yeast. Biochim. Biophys. Acta 649, 436-440.
19. **Knotková, A. y Kotyk, A.** 1981. Dependence of phosphate transport in yeast on glycolytic substrates. Folia Microbiol. 26, 377-381.
20. **Grenson, M.** 1992. Amino Acid Transporters in Yeast: Structure, Function and Regulation. In Molecular Aspects of Transport Proteins. Chapter 7 pp 219-245. Ed. by DePont. Elsevier Science. Publishers, B.V.
21. **Grenson, M., Mousset, M., Wiame, J.M. y Bechet, J.** 1966. Multiplicity of the amino acid permeases in *Saccharomyces cerevisiae*. I. Evidence for a specific arginine-transporting system. Biochim. Biophys. Acta 127, 325-338.
22. **Grenson, M.** 1966. Multiplicity of the amino acid permeases in *Saccharomyces cerevisiae*. II. Evidence for a specific lysine-transporting system. Biochim. Biophys. Acta 127, 339-346.
23. **Gits, J. y Grenson, M.** 1967. Multiplicity of the amino acid permeases in *Saccharomyces cerevisiae*. III. Evidence for a specific methionine-transporting system. Biochim. Biophys. Acta 135, 507-516.
24. **Bussey, H. y Umbarger, H.E.** 1970. Biosynthesis of the branched-chain amino acids in yeast: a trifluoroleucine-resistant mutant with altered regulation of leucine uptake. J. Bacteriol. 103(2), 286-294.

25. **Ramos, E.H., DeBongioanni, L.C., Cuesta Casado, M.C. y Stoppani, A.O.M.** 1977. Some properties of L-[¹⁴C]leucine transport in *Saccharomyces ellipsoideus*. *Biochim. Biophys. Acta* 467, 220-237.
26. **Grenson, M. y Dubois, E.** 1982. Pleiotropic deficiency in nitrogen-uptake systems and derepression of nitrogen-catabolic enzymes in npr-1 mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur. J. Biochem.* 121, 643-647.
27. **Grenson, M., Hou, C. y Crabeel, M.** 1970. Multiplicity of the amino acid permeases in *Saccharomyces cerevisiae*. IV. Evidence for a General Amino Acid Permease. *J. Bacteriol.* 103(3), 770-777.
28. **Rytka, J.** 1975. Positive selection of general amino acid permease mutants in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* 121(2), 562-570.
29. **Courchesne, W.E. y Magasanik, B.** 1983. Ammonia regulation of amino acid permeases in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 3, 672-683.
30. **Lasko, P.F. y Brandriss, M.C.** 1981. Proline transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* 148, 241-247.
31. **Grenson, M. y Acheroy, B.** 1982. Mutations affecting the activity and the regulation of the general amino-acid permease of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Gen. Genet.* 188,261-265.
32. **Jauniaux, J-C. y Grenson, M.** 1990. GAP1, the general amino acid permease gene of *Saccharomyces cerevisiae*. Nucleotide sequence, protein similarity with the other bakers yeast amino acid permeases, and nitrogen catabolite repression. *Eur. J. Biochem.* 190, 39-44.
33. **Rai, R., Genbauffe, F.S., Sumrada, R.A. y Cooper, T.G.** 1989. Identification of sequences responsible for transcriptional activation of the allantoin permease gene in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 9, 602-608.
34. **Bysani, N., Rai, R., Daugherty, J. y Cooper, T.G.** Saturation mutagenesis of the nitrogen catabolite repression-sensitive UAS that activates transcription of the allantoin pathway genes. *Yeast* 6, S237.
35. **Vandenbol, M., Jauniaux, J-C. y Grenson, M.** 1989. Nucleotide sequence of the *Saccharomyces cerevisiae* PUT4 proline-permease-encoding gene: similarities between CAN1, HIP1 and PUT4 permeases. *Gene* 83, 153-159.
36. **Magasanik, B.** 1992. Regulation of Nitrogen Utilization. In *The Molecular and Cellular Biology of the Yeast Saccharomyces*. Vol II: Gene Expression pp. 283-

317. Jones, E.W., Pringle, J.R. y Broach, J.R. Eds. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
37. **Minehart, P.L. y Magasanik, B.** 1991. Sequence and expression of *GLN3*, a positive nitrogen regulatory gene of *Saccharomyces cerevisiae* encoding a protein with a putative zinc finger DNA-binding domain. *Mol. Cell. Biol.* 11, 6216-6228.
38. **Grenson, M.** 1983. Inactivation-reactivation process and repression of permease formation regulate several ammonia-sensitive permeases in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur. J. Biochem.* 133, 135-139.
39. **Springael, J-Y. y André, B.** 1994. NPI1, a nitrogen permease inactivator protein from *Saccharomyces cerevisiae*, contains a new repeat motif and is related to human E6-AP, an ubiquitin-ligase component. Proc. of the 12th Small Meeting on Yeast Transport and Energetics. Karpacz, Poland.
40. **Dubois, E. y Grenson, M.** 1979. Methylamine/Ammonia uptake systems in *Saccharomyces cerevisiae*: Multiplicity and regulation. *Molec. Gen. Genet.* 175, 67-76.
41. **Vandenbol, M., Jauniaux, J-C. y Grenson, M.** 1990. The *Saccharomyces cerevisiae* NPR1 gene required for the activity of ammonia-sensitive amino acid permeases encodes a protein kinase homologue. *Mol. Gen. Genet.* 222, 393-399.
42. **Grenson, M.** 1983. Study of the positive control of the general amino-acid permease and other ammonia-sensitive uptake systems by the product of the NPR1 gene in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur. J. Biochem.* 133, 141-144.
43. **Jauniaux, J-C., Vandenbol, M., Vissers, S., Broman, K. y Grenson, M.** 1987. Nitrogen catabolite regulation of proline permease in *Saccharomyces cerevisiae*. Cloning of the PUT4 gene and study of PUT4 RNA levels in wild-type and mutant strains. *Eur. J. Biochem.* 164, 601-606.
44. **Dubois, E., Vissers, S., Grenson, M. y Wiame, J.M.** 1977. Glutamine and ammonium in nitrogen catabolite repression of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 75, 233-239.
45. **Courchesne, W.E. y Magasanik, B.** 1988. Regulation of nitrogen assimilation in *Saccharomyces cerevisiae*: Roles of the URE2 and GLN3 genes. *J. Bacteriol.* 170(2), 708-713.
46. **Conway, E.J. y Brady, T.G.** 1950. Biological production of acid and alkali:

I Quantitative relations of succinic and carbonic acids to the potassium and hydrogen ion exchange in fermenting yeast. *Biochem. J.* 47, 360-369.

47. **Ogino, T., Den Hollander, J.A. y Shulman, R.G.** 1983. ^{39}K , ^{23}Na , and ^{31}P NMR studies of ion transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 80, 5185-5189.
48. **Borst-Pauwels, G.W.F.H.** 1981. Ion Transport in Yeast. *Biochim. Biophys. Acta* 650, 88-127.
49. **Peña, A., Pardo, J.P. y Ramírez, J.** 1987. Early metabolic effects and mechanism of ammonium transport in yeast. *Arch. Biochem. Biophys.* 253, 431-438.
50. **Rodríguez-Navarro, A. y Ramos, J.** 1984. Dual system for potassium transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* 159, 940-945.
51. **Ramos, J. y Rodríguez-Navarro, A.** 1986. Regulation and interconversion of the potassium transport systems of *Saccharomyces cerevisiae* as revealed by rubidium transport. *Eur. J. Biochem.* 154, 307-311.
52. **Gustin, M.C., Martinac, B., Saimi, Y., Culberton, M.R. y Kung, C.** 1986. Ion channels in yeast. *Science* 233, 1195-1197.
53. **Roon, R.J., Levy, J.S. y Larimore, F.** 1977. Negative interactions between amino acid and methylamine ammonium transport systems of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 252, 3599-3604.
54. **Gómez, F.** 1986. Transporte de aminoácidos en levaduras *Saccharomyces cerevisiae*. Un estudio experimental y su análisis termodinámico. Tesis de Maestría. Fac. Química, UNAM.
55. **Rosas, G.** 1992. Efecto del potasio en el transporte de L-leucina en *Saccharomyces cerevisiae*. Tesis de Maestría. IBB. Instituto de Fisiología Celular. UNAM.
56. **Armstrong, W.McD. y Rothstein, A.** 1964. Discrimination between alkali metal cations by yeast. I. Effect of pH on uptake. *J. Gen. Physiol.* 48, 61-71.
57. **Sambrook, J., Fritsch, E.F. y Maniatis, T.** 1989. *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
58. **Carlson, M. y Botstein, D.** 1982. Two differentially regulated mRNAs with different 5' ends encoded secreted and intracellular forms of yeast invertase.

Cell 28, 145-154.

59. **Sheiness, D. y Sullivan, D.** 1986. Staining of RNA in formaldehyde gels. *Focus* 8, 11-15.
60. **Thomas, P.S.** 1980. Hybridization of denatured RNA and small DNA fragments transferred to nitrocellulose. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 77, 5201-5205.
61. **Church, G.M. y Gilbert, W.** 1984. Genomic sequencing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81, 1991-1995.
62. **Rosas, G., Gómez, F. y Peña, A.** 1994. Effect of potassium on amino acid transport in yeast. *Biochim. Biophys. Acta* 1195, 223-228.
63. **Marini, A-M., Vissers, S., Urrestarazu, A. y André, B.** 1994. Cloning and expression of the MEP1 gene encoding an ammonium transporter in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.* 13, 3456-3463.
64. **Horák, J., Sychrová, H. y Kotyk, A.** 1990. Phenylmethylsulfonylfluoride protects L-lysine transport in *Schizosaccharomyces pombe* against inactivation by ammonium ions. *Biochim. Biophys. Acta* 1023, 380-382.
65. **Hein, C. y André, B.** 1994. The general amino acid permease GAP1 is degraded during catabolite inactivation: mutations affecting the carboxy terminus of GAP1 make it resistant to triggered degradation. *Proc. of the 12th Small Meeting on Yeast Transport and Energetics.* Karpacz, Poland.

Effect of potassium on amino acid transport in yeast

Gisele Rosas^a, Froylán Gómez^b, Antonio Peña^{a,*}

^a Department of Microbiology, Institute for Cellular Physiology, Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado 70-242, 04510 Mexico City, D.F., Mexico

^b Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, Mor., Mexico

Received 22 February 1994; revised 13 July 1994

Abstract

Starved yeast cells accumulated potassium when the cation plus glucose was present in the incubation medium. Under these conditions, an increased amino acid transport capacity was developed within 30 to 60 min in comparison with cells incubated only with glucose. There seems to be a correlation between K⁺ accumulation and an increase of the amino acid transport activity. Preincubation in the presence of potassium also produced an increased general protein synthesis. Transport systems are strongly inactivated by ammonium and this effect is partially reverted by potassium preincubation. Results also showed that potassium could 'protect' the amino acid transport systems from the inactivation produced by ammonium. It appears that potassium preincubation may have some effect on the rate of synthesis of the amino acid carriers, but effects of potassium appear to exist also on the degradation or inactivation of the carriers.

Keywords: Amino acid transport; Potassium; (Yeast)

1. Introduction

Starved yeast cells show very low rates of amino acid transport; to be expressed completely, they require preincubation with glucose [1,2]. Kotyk et al. [3] showed that the recovery of transport during preincubation was due to de novo synthesis of the specific transport systems. There seems to be also a more general increase of transport systems when yeast cells are preincubated with glucose or other substrates [1–5].

Potassium stimulates the transport of amino acids [6], phosphate [3] and sulfate [7]. Stimulation of glycolysis and respiration has been also observed when yeast is incubated with K⁺ [8,9].

Besides protein synthesis, other factors modulate the activity of the membrane carriers of the yeast cell. Grenson et al. [10–13] studied the regulation of the adaptive transport systems by ammonium ions, detecting both inactivation–reactivation and repression of the general amino acid

permease (GAP1). It seems that the transcription of the mRNA for the permease is diminished by ammonium.

The present work is an effort to characterize and to explain the potassium effect on amino acid uptake by *Saccharomyces cerevisiae*.

2. Materials and methods

2.1. Chemicals

L-[4,5-³H]Leucine was obtained from ICN Radiochemicals (ICN Biomedicals), and L-[carbamoyl-¹⁴C]citrulline from Amersham International (Amersham, UK). All reagents were of the highest purity available. Cycloheximide was obtained from Sigma (St. Louis, MO, USA), ammonium chloride was from Merck (Rahway, NJ, USA), and DiSC₃(3) was obtained from Molecular Probes (Eugene, OR, USA).

2.2. Yeast

The experiments were performed with the facultative aerobic strains of *Saccharomyces cerevisiae* XT300.3A (a gift from Dr. A. Rodríguez-Navarro), Σ1278b and the general amino acid permease deficient mutant 2512c

Abbreviations: Mes, 2-(*N*-morpholino)ethanesulfonic acid; TEA, Triethanolamine; DiSC₃(3), 3,3-dipropylthiacarbocyanine; CCCP, carbonyl-cyanide *m*-chlorophenylhydrazone.

* Corresponding author. E-mail: apd@ifesun1.ifisiol.unam.mx. Fax: +52 56 225630.

(kindly donated by Dr. M. Grenson). The strains were grown aerobically at 30°C in Bacto Yeast Nitrogen Base Medium of Difco (Difco manual, 10th Edn.) using ammonium sulfate and glucose as nitrogen and carbon sources, respectively, in a gyratory shaker (at 250 rpm). Cells were harvested during the early stationary phase (13 to 15 h) and washed twice with double distilled water by centrifugation, and resuspended at 50% (w/v) in double distilled water.

2.3. Potassium accumulation

After preincubation of the cells, they were centrifuged and washed, and boiled in a water bath for 30 min. After centrifugation, the potassium concentration of an appropriate dilution of the supernatant was measured in a flame photometer.

2.4. Membrane potential

It was estimated as described [14], by following the changes of fluorescence at 540–590 nm of 125 nM DiSC₃(3), added to a suspension of 10 mg of yeast cells in Mes-TEA 20 mM (pH 6.0); 0.25 μM CaCl₂; 50 mM glucose and 6 μM CCCP.

2.5. Proton pumping

It was followed by means of a glass electrode and a pH meter connected to a recorder. 15 mg wet wt./ml of cells were preincubated for 60 min with 20 mM Mes-TEA (pH 6.0) and 150 mM glucose with or without 10 mM potassium. After centrifuging and washing, 10 mg of cells were incubated in 4 mM Mes adjusted to pH 6.0 with TEA, and 50 mM glucose, to follow the change of the pH of the medium.

2.6. Amino acid transport

Unless indicated differently, 15 mg wet wt./ml of yeast cells were placed in a buffer containing 20 mM Mes adjusted to pH 6.0 with TEA, and 150 mM glucose (control medium) and preincubated for 60 min at 30°C. KCl at variable concentrations and other additions are indicated in each case. After preincubation, cells were centrifuged and resuspended at the same concentration in the control medium without additions. After equilibrating the cell suspension for 2 min to 30°C in a water bath, the labeled amino acid to be transported was added (usually 200 μM L-[³H]leucine or 80 μM [¹⁴C]-L-citrulline). After 2.0 min, aliquots (0.1 ml) were taken and filtered through a Millipore nitrocellulose filter (0.45 μm pore) under vacuum and washed with 10 ml of 5 mM cold amino acid. The filters were placed in a vial containing a toluene-based scintillation liquid. Vials were counted in a Packard Tri-Carb Scintillation Spectrometer.

2.7. Protein synthesis

It was followed by incorporation of L-[³H]leucine (added at 200 μM during preincubation with or without potassium in the medium) into the trichloroacetic acid-insoluble material of the cells. Yeasts were incubated in the control medium plus the required additions at 30°C. At different times, samples were withdrawn and mixed with 1 ml of 10% trichloroacetic acid. The samples were placed 1 h at 4°C and then filtered and washed as above and used for scintillation counting. Where indicated protein synthesis was inhibited by adding 100 μM cycloheximide during or after preincubation.

2.8. Transport kinetic constants

They were calculated by the Inplot program (Graphpad Software, San Diego, CA, USA).

3. Results

When yeast cells were preincubated in the presence of K⁺, L-leucine uptake was stimulated several fold over the control, preincubated only with glucose (Fig. 1). Some variability was observed from one experiment to another, and although the maximum effect was observed at 120 min, further experiments were performed preincubating the cells for 60 min, at which, the stimulation of leucine transport by 10 mM K⁺ varied from 2.5- to 10-times. This increment was present at concentrations as low as 250 μM potassium (Fig. 2). The effect of K⁺ was much higher than that of other monovalent cations (Table 1); the observed stimulation followed the sequence K⁺, Rb⁺, Na⁺, Cs⁺, Li⁺. The effects of both K⁺ and Rb⁺ are similar to their relative rates of transport into yeast [15].

When yeast cells are incubated in the presence of potassium, there is an increase of the internal pH [9]. This

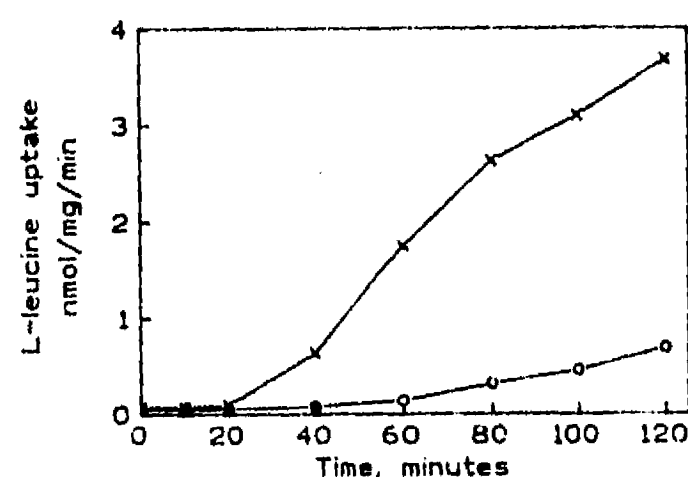


Fig. 1. Uptake of L-leucine by the yeast XT300.3A. Cells were preincubated at different times in the control medium (O) or in presence of potassium chloride 10 mM (X). The temperature was 30°C. After the preincubation they were centrifuged and resuspended in the control medium. The samples were preincubated for 2 min in the presence of 200 μM L-[³H]leucine.

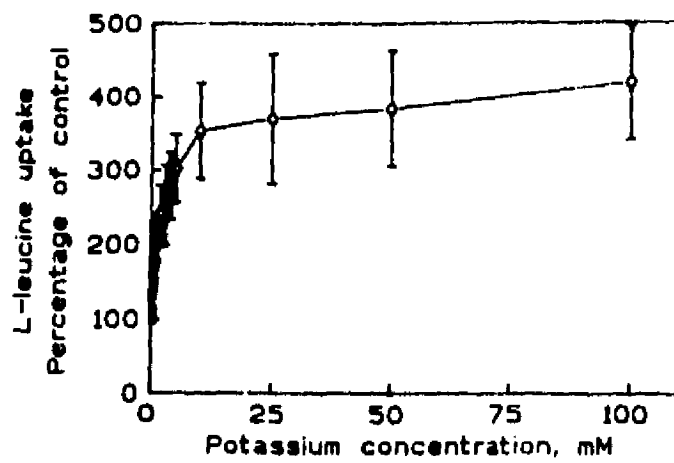


Fig. 2. Effects of potassium on the rate of transport of L-leucine. Yeast (XT300.3A) was preincubated for 60 min at 30°C in the control medium (glucose 150 mM, Mes-TEA 20 mM, pH 6) and in the presence of increasing concentrations of potassium chloride. Then the cells were centrifuged and resuspended in the same medium to which 200 μ M L-[³H]leucine was added. The samples were incubated for 2 min, and then the cells were filtered and washed as described in Section 2. The results are shown as percent of the control.

same internal alkalization can be observed if the cells are preincubated at high pH values [9] even in the absence of potassium. In order to test if an internal alkalization was responsible for the stimulation of the uptake of leucine, yeast cells were preincubated for 60 min at different pH values in the absence or presence of potassium, and then the rate of uptake of the amino acid was measured at pH 6. In the pH range tested (not shown), leucine uptake seemed to be independent of the preincubation pH under both conditions (with or without K⁺), and the preincubation at high pH did not increase the rate of leucine transport.

When yeast cells were preincubated with potassium ions, an important accumulation of the cation was observed (Table 2). It is also interesting that when these cells were placed in a potassium-free medium, a larger efflux of potassium was observed than with cells preincubated in the absence of potassium (not shown). The membrane potential difference, estimated with DiSC₃(3) [14] did not show significant differences between the cells that had been preincubated with glucose or glucose plus potassium. The proton pumping activity was also followed by the changes of the medium pH, and no differences were observed also

Table 1
Stimulation of L-leucine transport by preincubating yeast cells for 60 min in the presence of 10 mM monovalent cations. Correlation between cation transport affinities and its effects on leucine transport

Cation	Cation transport relative affinity [15]	Amino acid transport (nmol min ⁻¹ mg ⁻¹)
Li ⁺	2	0.67
Na ⁺	3	1.49
K ⁺	100	4.80
Rb ⁺	50	1.80
Cs ⁺	8	1.15

Experimental conditions were as for Fig. 2. Transport in the absence of cations was 1.0 nmol mg⁻¹ min⁻¹.

Table 2
Intracellular potassium after preincubating different strains of yeast with glucose or glucose plus potassium

Preincubation	XT300.3A	Σ1278b	2512c
Not preincubated	187 ± 1.1	192 ± 0	191 ± 4
Glucose	212 ± 28	190 ± 18	193 ± 40
Potassium 10 mM	336 ± 44	297 ± 18	323 ± 38

The cells (7.5 mg/ml) were preincubated for 60 min in the control medium or in presence of KCl 10 mM. Then the samples were centrifuged and the pellet was resuspended in bidistilled water and the tubes were immersed in boiling water for 30 min. The cells were centrifuged and potassium was determined in the supernatant in a Zeiss flame photometer. Results are indicated as the intracellular concentration (mM), calculated on the basis of a water content equal to 50% of the wet weight of the cells. The standard deviations are from 6 separate experiments. The wild-type strain Σ1278b was included to compare with the 2512c mutant strain.

between the cells preincubated under these two conditions (not shown).

Kotyk et al. [3] reported that when yeast cells are preincubated for long periods in the presence of glucose, a parallel increment between the transport activity and the synthesis of the proteins mediating transport is observed. In *S. cerevisiae* preincubated in the presence of glucose alone, or with 10 mM K⁺, the same correlation between transport and general protein synthesis was observed (Fig. 3); a higher incorporation of L-[³H]leucine into trichloroacetic insoluble material was observed when the cells were preincubated in the presence of potassium than in the cells preincubated with glucose alone. If these experiments were carried out in the presence of cycloheximide, the incorporation of labeled amino acid was prevented (not shown).

Added after preincubation in the presence of glucose or glucose plus KCl, cycloheximide stopped the general protein synthesis and the increase of the uptake of leucine. However, in yeast preincubated with potassium, although the increase in the rate of transport was stopped by cycloheximide, a much slower decay of the transport was observed, compared with the yeast preincubated with glu-

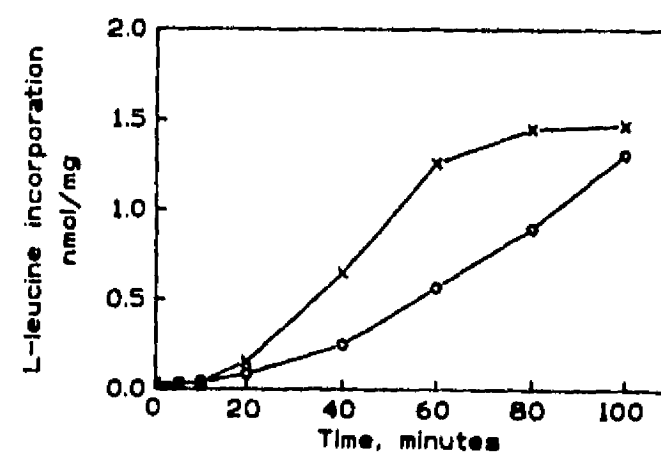


Fig. 3. Rate of incorporation of L-[³H]leucine into trichloroacetic acid-insoluble material by yeast cells preincubated in the presence of glucose (O), or glucose plus 10 mM KCl (X). Experimental conditions were similar to Fig. 1, and the incorporation of labeled leucine was measured as described in Section 2.

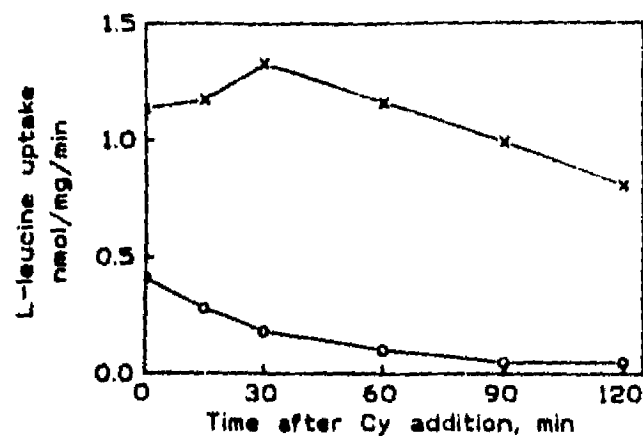


Fig. 4. Decay of transport activity after cycloheximide (Cy) addition. After the wild-type strain XT300.3A cells were preincubated 60 minutes at 30°C with glucose (O) or glucose plus 10 mM of potassium chloride (X), 100 μ M cycloheximide was added and at several times samples were centrifuged and resuspended in the control medium. The samples were preincubated for 2 min in the presence of 200 μ M L-[³H]leucine and its transport was measured.

cose only (Fig. 4). While those cells preincubated with glucose lost close to 90% of the transport activity 120 min after the addition of cycloheximide, those preincubated with glucose plus potassium maintained around 80% of the transport activity after the same time of addition of the inhibitor.

There is a mutant (gap^- , 2512c), described by Grenson et al. [10], lacking the general amino acid permease, which offers the possibility of defining the involvement of this permease in the activation of amino acid transport by potassium. As expected, no citrulline transport activity was observed in the mutant strain gap^- (not shown), independently of the preincubation conditions. On the other hand, when the mutant strain was compared to its corresponding parental wild type strain (Σ 1278b), no potassium stimulation of leucine uptake was observed in the mutant cells, compared to the wild-type yeast (Fig. 5), in which the increase in the transport by potassium preincubation was similar to that observed in the wild-type strain XT300.3A used in the other experiments. Fig. 6 also shows that following the time-course, neither leucine uptake rate nor

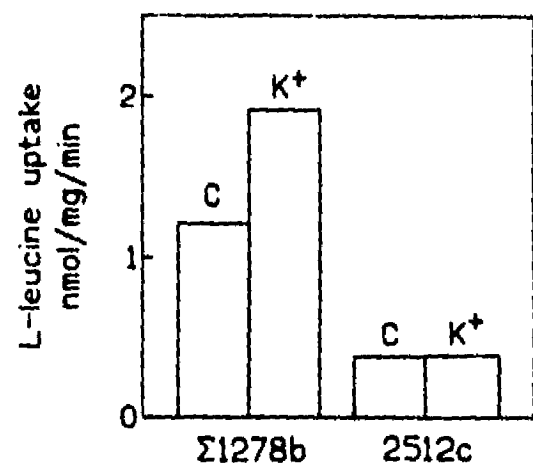


Fig. 5. Effect of potassium preincubation on L-leucine transport in the wild-type yeast Σ 1278b and in the mutant yeast 2512c lacking GAP1. After preincubation for 60 min with glucose or with glucose plus potassium, centrifugation and resuspension in control medium, the cells were incubated for 2 min in the presence of 200 μ M of L-[³H]leucine, to measure its transport as described in Section 2.

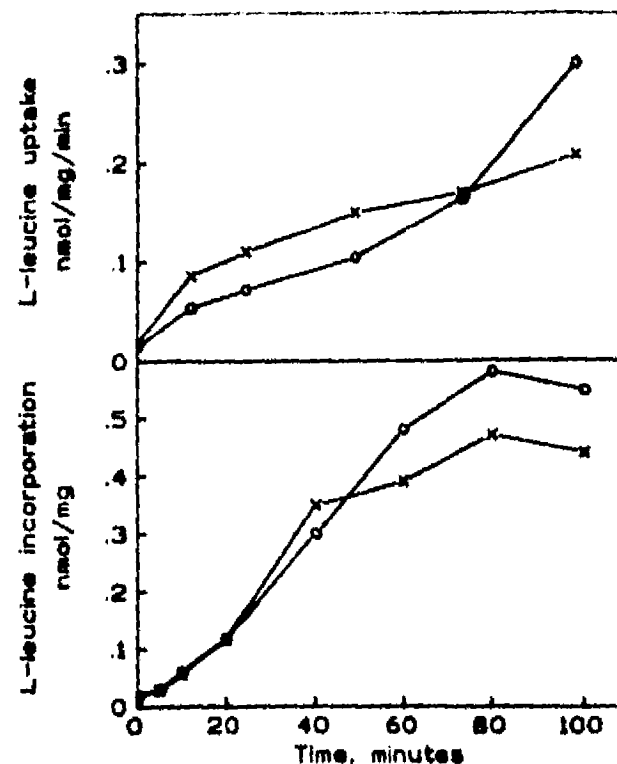


Fig. 6. Effects of preincubation with glucose (O) or glucose plus potassium (X) of the gap^- mutant 2512c, on the amino acid transport activity (upper panel) and amino acid incorporation into trichloroacetic acid-insoluble material (lower panel). The experiment was carried out as described for Figs. 1 and 3.

protein synthesis were increased in the 2512c mutant strain 2512c, by preincubation with 10 mM potassium.

L-citrulline is transported in yeast through the general amino acid permease [10]. The use of this amino acid then, offers another possibility to study the effects of potassium preincubation on this transport system in a more specific way. To this purpose, we compared the kinetics of citrulline transport in cells preincubated with glucose, as compared to those preincubated with potassium. Fig. 7 shows that when yeast cells of the strain XT300.3A were preincubated with potassium, a clear one-component kinetics was observed, with K_m values of 125 and 103 μ M, and V_{max} of 3.57 and 3.47 $\text{nmol mg}^{-1} \text{min}^{-1}$, obtained in two separate experiments. However, in the cells preincubated with glucose alone, only a very small uptake of the amino acid was observed, which had no relation to its added concentration (Fig. 7).

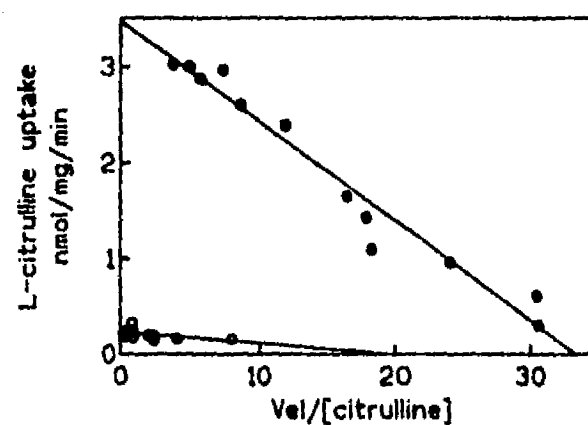


Fig. 7. Kinetics of L-citrulline transport in yeast cells preincubated with glucose (O) or with glucose plus 10 mM KCl (●) for 60 min. Experimental conditions were as for Fig. 1, but varying concentrations of citrulline were used.

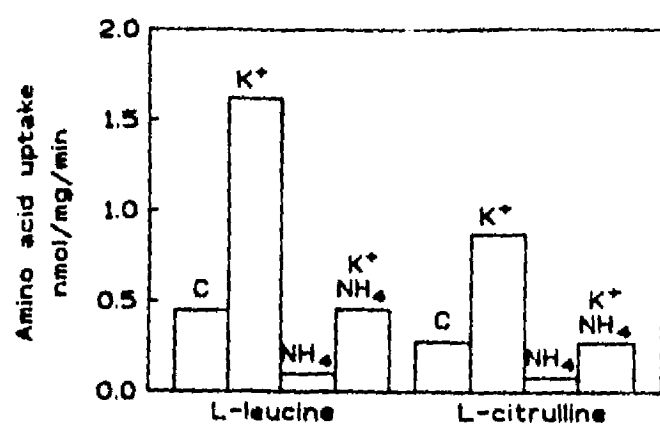


Fig. 8. Effects of preincubation of yeast cells (XT300.3A) with ammonium and potassium, on leucine and citrulline transport activity. Control (C); KCl 10 mM (K⁺); NH₄Cl 10 mM (NH₄⁺); equimolar concentrations (10 mM) of KCl and NH₄Cl (K⁺-NH₄⁺). 200 μM of L-[³H]leucine and 80 μM of L-[¹⁴C]citrulline were used. Experimental conditions were as for Fig. 5.

As reported before by Grenson [12], the addition of ammonium greatly decreased the transport of leucine, tested in our wild-type XT300.3A strain preincubated with glucose; Fig. 8 (bar #3) shows the results. However, the preincubation in the presence of equimolar (10 mM) concentrations of potassium and ammonium partially prevented the inactivation produced by ammonium (Fig. 8, bar #4). Besides, similar results were obtained for the transport of leucine or citrulline.

4. Discussion

The data obtained from this study suggest that the stimulation on the amino acid transport activity by K⁺ may be related to the transport of the cation, because of the following facts: (a) the potassium effect was observed starting at low concentrations of the cation, similar to those required for its transport. (b) There is a similar selectivity of the transport system for monovalent cations [15] and their effect on the transport of leucine. (c) Potassium was accumulated when the cells were preincubated in its presence, suggesting a relation between its accumulation and the amino acid transport increase. Intracellular K⁺, when the cation was present at 10 mM in the medium during preincubation, was increased around 60%. Another possibility to explain the results is the internal alkalization resulting from the transport of potassium into the cells [9], which may result from the increased H⁺ pumping observed in the presence of the monovalent cation(s), which has been observed also by Kotyk et al. [16]. However, our experiments carried out (not shown) in which this internal alkalization was provoked by preincubating the cells at high pH values showed that it is not responsible for the increase of amino acid transport; the cells preincubated at high pH in the presence of glucose did not show an increased transport, and this transport was still stimulated by K⁺ to a similar extent to that observed in cells preincubated at lower pH values.

The increase of the amino acid transport is blocked by cycloheximide, probably because, as shown before for glucose incubation [3], it requires the synthesis of the carriers. Besides, the time-course of the transport capacity was similar to that of protein synthesis, as shown by following the incorporation of labelled leucine into trichloroacetic acid insoluble material. Cycloheximide also inhibited the further increase of leucine transport activity after preincubation with potassium. This indicates that the potassium effect during preincubation may require an increase of the carrier molecules, although a role of the monovalent cation on the activation of the carriers cannot be ruled out. Since it was also possible to demonstrate a major general increase in protein synthesis when the cells were preincubated in the presence of glucose plus potassium, as compared to glucose alone, it is possible that the potassium accumulation during preincubation increased the rate of synthesis of the carrier.

The increased activity of the carrier could be observed when following the uptake of L-citrulline, which is transported through the general amino acid permease (GAP1, Ref. [10]) and it was not found in the mutant cells which lack this system. Besides, it is striking that citrulline transport, occurring only through this permease seemed not to be active at all, unless potassium was present during preincubation of the cells. This may further indicate that the accumulation of K⁺ during preincubation could stimulate the synthesis of this carrier.

Similar to what Sychrová et al. described [17,18] in *Schizosaccharomyces pombe*, the transport of L-leucine in *Saccharomyces cerevisiae* does not appear to be constitutive; a preincubation with glucose was required to observe leucine transport (Fig. 1). Besides, in the presence of K⁺, the cation is rapidly accumulated (data not shown) by the cells, and it seems to further stimulate the synthesis of the amino acid carrier.

As reported by Grenson et al., the transport systems were found to be inactivated to very low levels by ammonium ions [10]. This effect was partially reverted by potassium preincubation (Fig. 8); the lower inactivation of these systems by ammonium might be related to the increased rate of the general protein synthesis obtained when yeast was preincubated in the presence of potassium. Horák et al. [19] also described that the inactivation of L-lysine transport by ammonium preincubation could be overcome by the de novo synthesis of the carrier protein in *Schizosaccharomyces pombe*. It seems that the presence of potassium in the medium could 'protect' the amino acid transport systems from the inactivating effect of ammonium, suggesting opposite effects by the two cations.

The repression of GAP1 permease synthesis due to the presence of ammonium ions, seems to involve the formation and/or stability of the GAP1 messenger RNA [20]. In the light of these results, potassium might be acting at the transcription level competing against ammonium. The data on the disappearance of the amino acid transport capacity

of the cells after the addition of cycloheximide also indicate that K^+ has an effect resulting in a higher stability of the carrier than in cells preincubated with glucose alone. This may be due to effects of the cation on the inactivation or degradation of the permease, indicating that something else besides protein synthesis is responsible for the difference of transport activity.

In summary, it appears that K^+ , accumulated by the cells during preincubation, could have some effect on the rate of synthesis of the amino acid carriers, and this effect is more evident on the general amino acid permease. However, the effects of K^+ appear to be also on the degradation or inactivation of the carriers.

Acknowledgements

This work was partially supported by grants No. IN-206689 from the Dirección General de Asuntos del Personal Académico of this University, and No. 0668-N9108 from the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología of Mexico.

References

- [1] Horák, J., Rihová, L. and Kotyk, A. (1981) *Biochim. Biophys. Acta* 649, 436–440.
- [2] Knotková, A. and Kotyk, A. (1981) *Folia Microbiol.* 26, 377–381.
- [3] Kotyk, A., Horák, J. and Knotková, A. (1982) *Biochim. Biophys. Acta* 698, 243–251.
- [4] Ramos, E.H., De Bongioanni, L.C. and Stoppani, A.O.M. (1980) *Biochim. Biophys. Acta* 599, 214–231.
- [5] Kotyk, A. and Rihová, L. (1972) *Folia Microbiol.* 17, 261.
- [6] Eddy, A.A. and Indge, K.L. (1962) *Biochem. J.* 82, 15–16.
- [7] Goodman, J. and Rothstein, A. (1957) *J. Gen. Physiol.* 40, 915–923.
- [8] Peña, A., Cinco, G., Gómez-Puyou, A. and Tuena, M. (1969) *Biochim. Biophys. Acta* 180, 1–8.
- [9] Peña, A., Cinco, G., Gómez-Puyou, A. and Tuena, M. (1972) *Arch. Biochem. Biophys.* 153, 413–425.
- [10] Grenson, M., Hou, C. and Craebel, M. (1970) *J. Bacteriol.* 130, 770–777.
- [11] Grenson, M. (1983) *Eur. J. Biochem.* 133, 135–139.
- [12] Grenson, M. (1983) *Eur. J. Biochem.* 133, 141–144.
- [13] Jauniaux, J.-C. and Grenson, M. (1990) *Eur. J. Biochem.* 190, 39–44.
- [14] Peña, A., Uribe, S., Pardo, J.P. and Borbolla, M. (1984) *Arch. Biochem. Biophys.* 231, 217–225.
- [15] Armstrong, W.McD. and Rothstein, A. (1964) *J. Gen. Physiol.* 48, 61–71.
- [16] Kotyk, A., Dvůráková, M. and Georghiou, G. (1992) *Biochem. Int.* 28, 1089–1096.
- [17] Sychrová, H., Horák, J. and Kotyk, A. (1989) *Biochim. Biophys. Acta* 978, 203–208.
- [18] Sychrová, H., Horák, J. and Kotyk, A. (1989) *Yeast* 5, 199–207.
- [19] Horák, J., Sychrová, H. and Kotyk, A. (1990) *Biochim. Biophys. Acta* 1023, 380–382.
- [20] Jauniaux, J.-C. and Grenson, M. (1990) *Eur. J. Biochem.* 190, 39–44.

APENDICE

Title:

**REGULATION OF YEAST GENERAL AMINO ACID PERMEASE (GAP1)
ACTIVITY BY POTASSIUM**

Authors:

GISELE ROSAS AND ANTONIO PEÑA*

Corresponding author:

Antonio Peña

Department of Microbiology

Institute for Cellular Physiology

Universidad Nacional Autónoma de México

Apartado 70-242

04510, México, D.F. México

Fax: (525) 622-5630

Tel: (525) 622-5633

E-mail: apd@ifcsun1.ifisiol.unam.mx

KEY WORDS: Amino acid transport regulation; potassium; yeast

ACKNOWLEDGEMENTS:

This work was partially supported by grants No. IN-202193 from the Dirección General de Asuntos del Personal Académico of this University, and No. 3188N from the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología of Mexico.

ABSTRACT

The effect of potassium preincubation of yeast cells on the General Amino Acid Permease (GAP1) regulation was studied in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Citrulline uptake was increased in cells preincubated with potassium. Under these conditions a several fold increase in citrulline transport activity, as compared with cells incubated only with glucose, was observed. This activating effect by potassium was not observed when protein synthesis was blocked by cycloheximide. This indicates that potassium elicited an additional *de novo* synthesis of GAP1 thus increasing the transport capacity of yeast. Preincubation in the presence of potassium also prevented the inactivation of amino acid permease and repression of GAP synthesis by ammonium. This conclusion was further supported by the analysis of the GAP1 mRNA contents of cells preincubated with and without potassium, ammonium, or both. Analogous experiments with a *Saccharomyces cerevisiae* mutant deficient in NPR1 (the protein that reactivates the GAP permease) revealed that potassium was unable to increase amino acid uptake to the rates reached by the wild-type strain. This suggested that potassium exhibits a dual effect: it initiates an additional protein synthesis of the GAP1 permease and it interacts with NPR1 product to increase the activity of the existing permease in the plasma membrane.

INTRODUCTION

Expression and activity of amino acid transport systems in yeast are controlled and modulated by several types of regulation (Grenson, 1992; Horák, 1986). To be expressed, amino acid transport requires preincubation in the presence of glucose or other substrates (Horák *et al*, 1981; Knotková and Kotyk, 1981; Kotyk *et al*, 1982). Besides, it has been demonstrated that recovery of transport during preincubation with glucose is due to *de novo* synthesis of the transport systems (Kotyk *et al*, 1982).

A different type of modulation was described by Grenson (Grenson *et al*, 1970; Grenson, 1983a,b; Jauniaux and Grenson, 1990). These authors studied the regulation of the adaptative transport systems by the nitrogen source available in the medium. When cells are grown in the presence of preferred nitrogen sources such as ammonium ions, asparagine and glutamine; amino acid permease synthesis is inhibited by the regulatory mechanism known as Nitrogen Catabolite Repression (NCR) (Grenson, 1992; Wiame *et al*, 1985). This regulation involves repressed transcription of the permease genes or altered transcript stability (Jauniaux *et al*, 1987; Jauniaux and Grenson, 1990). Ammonium ions (NH_4^+) also inactivate the General Amino Acid Permease (GAP1) by a regulation system called Nitrogen Permease Inactivation (NCI) in which the addition of ammonium ions or a derivative inactivates the GAP1 permease by a mechanism involving the NPI proteins (for

nitrogen-permease inactivation) and the NPR1 protein (for nitrogen-permease reactivation), either because ammonium ions inactivate the NPR1 protein, or because they activate the NPI system that becomes predominant (Grenson, 1983b; Grenson, 1992).

Potassium ions (K^+) seem to be involved in the activation of several yeast uptake systems and other processes. This cation stimulates the transport of amino acids (Eddy and Indge, 1962; Rosas *et al*, 1994), phosphate (Knotková and Kotyk, 1981; Goodman and Rothstein, 1957; Peña and Ramírez, 1986), and sulfate (Horák *et al*, 1981). Stimulation of glycolysis and respiration has been also observed when yeast are incubated with potassium or at high pH values of the medium (Peña *et al*, 1969, 1972).

Potassium preincubation in yeast produces an accumulation of the cation as well as an increase in amino acid transport activity. In this conditions potassium also protects amino acid uptake systems from the inactivation produced by ammonium (Rosas *et al*, 1994).

We show here that potassium preincubation has an effect on the rate of synthesis of the General Amino Acid Permease (GAP1), and it also seems to have an effect on its regulation.

MATERIALS AND METHODS

Strains, plasmids and growth

The strains of *Saccharomyces cerevisiae* used in this study are described in Table 1. The mutants are isogenic with the wild-type strain Σ 1278b, except for the mutations mentioned.

The strains were grown as previously described (Rosas *et al*, 1994). Cells were harvested during the early stationary phase (13-15 hr for the wild-type strain XT300.3A; 22 hr for *npr1* mutant; and 18 hr for *npr1,npi1* double mutant), washed twice with double distilled water by centrifugation, and resuspended at 50 % (w/v) in double distilled water.

Plasmid pYA102 (a kind gift of Dr. A. González, UNAM, México), contains a portion of the *tcm1* gene (that codes for actin protein) on a 1.5 Kb BamH1-HindIII DNA fragment. This fragment was used as an internal control for Northern blot analysis.

Plasmid pJCJ252 was a generous gift of Dr. M. Grenson, ULB, Belgium; it contains the *GAP1* gene (coding for the General Amino Acid Permease) on a 4.2 Kb XhoI-XhoI DNA fragment (Jauniaux and Grenson, 1990).

Amino acid transport and protein synthesis

Transport was measured as described before (Rosas *et al*, 1994). Incorporation of 80 μ M of L-[carbamoyl- 14 C] Citrulline into proteins, occurring probably through its

conversion to arginine, was also followed by measuring the radioactivity incorporated into the trichloroacetic acid-insoluble material of the cells. Where indicated protein synthesis was inhibited by adding 100 μ M cycloheximide.

Methylamine uptake

Yeast cells were grown aerobically on minimal proline medium (1 mg/ml) as the only nitrogen source, and were harvested during the exponential phase (6 hours), and resuspended at 50 % (w/v) in minimal proline medium. [14 C]-methylamine transport was measured as described for the amino acids. For the competition experiments, different concentrations of potassium were added simultaneously with the labeled methylamine. Transport kinetic constants were calculated using the Inplot program (Graphpad Software, San Diego, CA, USA).

Purification and labelling of DNA fragments

DNA fragments were purified from agarose gels using the Low-melting-temperature agarose method (Weislander, 1979). Fragments were radioactively labelled with [α - 32 P]dCTP (3000 Ci mmol $^{-1}$, NEN Research Products) using the Random-primed DNA labelling Kit from GIBCO, BRL.

Northern analysis

Before RNA purification yeast cells were preincubated for 20, 40 and 60 minutes in a buffer containing 20 mM MES-TEA, pH 6.0 (2-N-morpholino

ethanesulfonic acid, adjusted to pH 6.0 with triethanolamine) and 150 mM glucose plus the following additions: 10 mM KCl, 10 mM NH₄Cl, or 10 mM of both cations. Total RNA was prepared according to Carlson and Botstein (1982) and separated by electrophoresis, and transferred to a nylon membrane (Hybond N, Amersham) using the methods described by Sheiness and Sullivan (1986) and Thomas (1980). Conditions of hybridization were those reported by Church and Gilbert (1984).

Chemicals

L-[carbamoyl-¹⁴C]Citrulline was obtained from Amersham International (Amersham, UK); L-[4,5-³H]Leucine from ICN Radiochemicals (ICN Biomedicals) and [¹⁴C]-Methylamine hydro-chloride from NEN Products (DuPont). Molecular biology products were purchased from GIBCO-BRL, Boehringer Mannheim or Amersham Laboratories. All reagents were of the highest purity available.

RESULTS

Potassium effects on L-citrulline uptake

Citrulline is taken up by yeast exclusively through the general amino acid permease (GAP1) (Grenson *et al*, 1970). Preincubation of the cells in the presence of different potassium concentrations produced an important increase in citrulline transport even at low K^+ concentrations and it reached a plateau at 5-10 mM of the cation (Fig.1). When the cells were preincubated in the presence of 10 mM K^+ , L-citrulline uptake was stimulated several fold over the control preincubated only with glucose (Fig.2). This increase started after approximately 20 min, and reached a maximum after 2 hours of preincubation while in the cells preincubated with glucose, the increase was much slower and persisted even after the same period of two hours.

It has been described that the capacity of amino acid transport systems increases after preincubation with glucose or analogous carbon sources (Kotyk *et al* 1982; Rosas *et al*, 1994). Following the incorporation of the citrulline label to the trichloroacetic acid-insoluble material, a parallel increment between transport activity and the protein synthesis was observed (Fig. 3); *i. e.*, a higher incorporation of citrulline into the trichloroacetic insoluble material was obtained in the cells preincubated in the presence of 10 mM K^+ compared with those preincubated with glucose alone.

Amino acid uptake and the inhibition of protein synthesis

Potassium preincubation seems to be related with *de novo* synthesis of amino acid carriers (Rosas *et al*, 1994). In order to find out if K^+ was not producing an increased synthesis of the cation, but the activation of the carrier synthesized during preincubation with glucose; the cation was added after preincubating for 60 min with glucose, either in the presence or in the absence of cycloheximide. When cells were preincubated 60 minutes in the presence of glucose alone, cycloheximide addition stopped protein synthesis and transport capacity was decreased (Fig. 4). The addition of K^+ plus cycloheximide to these cells equally stopped the transport activity of citrulline (or leucine). However, when potassium was added to the cells previously preincubated 60 min only with glucose, a high citrulline (or leucine) uptake capacity was developed, indicating that K^+ is able to produce an additional protein synthesis of GAP1 system (Fig.4).

*L-citrulline transport in mutants *npr1* and *npr1-npi1**

Grenson (1983b) found that ammonium addition to yeast cells growing in the presence of a nonrepressor medium, like proline, inhibited the amino acids uptake through the GAP1. This inhibition can be partially prevented if cells are preincubated in the simultaneous presence of NH_4^+ plus K^+ ions (Rosas *et al*, 1994). On the other hand, GAP1 activity involves the participation of the products of other genes; among them, NPR1 gene and NPI genes, which regulate GAP1 activity (Grenson, 1983b). We measured citrulline uptake under different preincubation conditions in two of these

mutants, one lacking the NPR1 gene, and a double mutant lacking the NPR1 and the NPI1 genes. Figure 5 shows that in the *npr1* mutant, preincubation in the presence of K^+ did not increase citrulline uptake to the levels reached in the wild-type strain; NH_4^+ preincubation inhibited its transport and preincubation with both cations (K^+ and NH_4^+) produced the same uptake as in the control. In the double mutant *npr1-npi1*, neither K^+ nor NH_4^+ , produced the effect shown by the wild-type strain, meaning that potassium did not increase transport and ammonium did not inhibited it. It is however, remarkable, that in this mutant citrulline uptake was found higher than in the wild-type strain (insert of Fig. 5).

Methylamine uptake inhibition by potassium ions

Considering that both cations (K^+ and NH_4^+) have opposite effects on the uptake of citrulline and other amino acids (Rosas *et al*, 1994), competition experiments were performed using the methyl analogous of ammonium, methylamine (Roon *et al*, 1975). Uptake of methylamine/ammonium in *Saccharomyces cerevisiae* is mediated through two distinct systems: a high affinity, low capacity system, and a low affinity, high capacity system (Dubois and Grenson, 1979). Table 2 shows the kinetic parameters obtained for methylamine uptake and competition in the presence of several potassium concentrations. At the three K^+ concentrations used, a mixed-type inhibition was obtained, affecting both affinity (K_m) and maximal velocity (V_{max}) of methylamine transport; however, this inhibition was not very high.

Effect of potassium on GAP1 mRNA transcription

Yeast cells preincubated in the presence of potassium show both a higher amino acid uptake activity and an increased protein synthesis (Fig. 4) (Rosas *et al*, 1994). Since in a mutant lacking the GAP1 permease K^+ did not increase amino acid uptake, it was suggested that GAP1 synthesis or transcription might be stimulated by the cation. A Northern blot analysis of total RNA (Fig. 6, N lane) confirmed that as Jauniaux and Grenson (1990) described, GAP1 transcription was inhibited in cells preincubated in the presence of ammonium. Contrary to the expected, K^+ preincubation did not increase GAP1 transcription (Fig. 6, K lane). However, as shown for GAP1 activity, messenger transcription was "protected" from ammonium repression if cells were preincubated in the simultaneous presence of K^+ and ammonium (Fig. 6, K+N lane). A densitometric analysis of the bands indicated that K^+ had a scarce effect on RNA transcription (not shown).

DISCUSSION

The general amino acid permease (GAP1) is a useful model for the study of amino acid transport regulation in yeast cells (Grenson, 1983b; Wiame *et al*, 1985; Grenson, 1992). We studied the effects of K^+ and ammonium on citrulline uptake because this amino acid is taken up only through GAP1 permease, making sure that the effects of the cations are related to this permease.

Potassium effects are produced by its previous accumulation inside the cells during preincubation (Rosas *et al*, 1994), and not on the amino acid uptake process. In fact, the simultaneous addition of amino acids and K^+ inhibits the uptake of the former, probably because of the decrease of the membrane potential produced by the addition of the inorganic cation (Peña *et al.*, 1984). On the other hand, experiments made growing the cells in a repressor medium, using ammonium as the nitrogen source, imply that yeast cells do not have an active GAP1 permease and its expression is also inhibited; this allows to study the permease activity under different preincubation conditions.

The results indicate that K^+ is related on GAP1 activity, synthesis and stability. Citrulline uptake in yeast preincubated in the presence of potassium was increased, and the increment was detected not only in activity, but also in citrulline incorporation to proteins (Figs. 1 to 3). Even though citrulline is not a component of

proteins, it is a precursor of arginine biosynthesis, and its incorporation to total protein synthesis must take place through its conversion into arginine, a common amino acid of proteins.

Since in yeast cells preincubated with K^+ , citrulline incorporation was higher compared to those cells preincubated only with glucose, it seems clear that K^+ increases *de novo* synthesis of the carrier. In cells preincubated with glucose only, which had an active GAP1 permease, the addition of K^+ increased its activity significantly, but this did not happen when protein synthesis was stopped with cycloheximide (Fig.4). With these data it is possible to conclude that the stimulation of amino acid uptake was not due to the activation of the existing carrier molecules, but to an additional *de novo* synthesis of the GAP1 permease.

Potassium preincubation in yeast cells not only produced an increase on amino acid uptake, but it also prevented the permease activity inhibition by ammonium when the cation was present together with ammonium ions (Rosas *et al*, 1994; Fig. 5). Horák *et al* (1990) demonstrated that inactivation produced by ammonium can be overcome if *de novo* synthesis of the amino acid carriers is induced. The data agree with those obtained in this work and emphasize the importance of protein synthesis on the activity of carrier systems, at the same time, the effect of potassium appears to be due both to an increase of the *de novo* synthesis of GAP1 permease and, a diminution or prevention of inactivation by ammonium ions.

Experiments performed in the mutant strains lacking NPR1 and NPI1 proteins indicate that the absence of the proteins involved in the reactivation-inactivation

mechanism, allows the cells, not only to lose the sensitivity to K^+ , but also to show a high citrulline uptake activity, independently of the presence of K^+ and ammonium ions, suggesting that both cations can influence this mechanism. It is possible that K^+ could be shifting the equilibrium towards the reactivating protein NPR1 and therefore the activity of NPI proteins is diminished, in this form, K^+ could be protecting GAP1 protein from inactivation or degradation produced by ammonium.

Even though preincubation with K^+ did not lead to an increment in mRNA for GAP1, its presence prevents the repression of messenger transcription produced by ammonium. It appears that K^+ accumulation by the cells results in a higher stability of the GAP1 mRNA when ammonium ions are present. Experiments on RNA stability should be done in order to find out if potassium is able to increase the stability.

In summary, potassium accumulation seems to be required in order to stimulate GAP1 synthesis, diminish its degradation, and to produce an increase of the activity of the carrier, without necessarily increasing the rate of transcription.

REFERENCES

- Carlson, M. and Botstein, D. (1982). Two differentially regulated mRNAs with different 5' ends encoded secreted and intracellular forms of yeast invertase. *Cell* **28**, 145-154.
- Church, G.M. and Gilbert, W. (1984). Genomic sequencing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**, 1991-1995.
- Dubois, E. and Grenson, M. (1979). Methylamine/Ammonia uptake systems in *Saccharomyces cerevisiae*: Multiplicity and regulation. *Molec. Gen. Genet.* **175**, 67-76.
- Eddy, A.A. and Indge, K.L. (1962). The dependence of amino acid transport in yeast on both energy supply and intracellular potassium ions. *Biochem. J.* **82**, 15-16.
- Goodman, J. and Rothstein, A. (1957). The active transport of phosphate into the yeast cell. *J. Gen Physiol.* **40**, 915-923.
- Grenson, M. (1992). Amino Acid Transporters in Yeast: Structure, Function and Regulation. *In Molecular Aspects of Transport Proteins, Elsevier Sc. Publ.* pp. 219-345.
- Grenson, M. (1983a). Inactivation-reactivation process and repression of permease formation regulate several ammonia-sensitive permeases in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur. J. Biochem.* **133**, 135-139.
- Grenson, M. (1983b). Study of the positive control of the general amino-acid permease

- and other ammonia-sensitive uptake systems by the product of the NPR1 gene in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur. J. Biochem.* **133**, 141-144.
- Grenson, M., Hou, C. and Crabeel, M. (1970). Multiplicity of the amino acid permeases in *Saccharomyces cerevisiae*. IV. Evidence for a General Amino Acid Permease. *J. Bacteriol.* **103**, 770-777.
- Horák, J., Sychrová, H. and Kotyk, A. (1990). Phenylmethylsulfonylfluoride protects L-lysine transport in *Schizosaccharomyces pombe* against inactivation by ammonium ions. *Biochim. Biophys. Acta* **1023**, 380-382.
- Horák, J. (1986). Amino Acid Transport in eucaryotic microorganisms. *Biochim. Biophys. Acta* **864**, 223-256.
- Horák, J., Rihová, L. and Kotyk, A. (1981). Energization of sulfate transport in yeast. *Biochim. Biophys. Acta* **649**, 436-440.
- Jauniaux, J-C., and Grenson, M. 1990. GAP1, the general amino acid permease gene of *Saccharomyces cerevisiae*. Nucleotide sequence, protein similarity with the other bakers yeast amino acid permeases, and nitrogen catabolite repression. *Eur. J. Biochem.* **190**, 39-44.
- Jauniaux, J-C., Vandebol, M., Vissers, S., Broman, K. and Grenson, M. (1987). Nitrogen catabolite regulation of proline permease in *Saccharomyces cerevisiae*. Cloning of the PUT4 gene and study of PUT4 RNA levels in wild-type and mutant strains. *Eur. J. Biochem.* **164**, 233-239.
- Knotková, A. and Kotyk, A. (1981). Dependence of phosphate transport in yeast on glycolytic substrates. *Folia Microbiol.* **26**, 377-381.

- Kotyk, A., Horák, J. and Knotková, A. (1982). Transport protein synthesis in non-growing yeast cells. *Biochim. Biophys. Acta* **698**, 243-251.
- Peña, A., Cinco, G., Gómez-Puyou, A. and Tuena, M. (1969). Studies on the mechanism of the stimulation of glycolysis and respiration by K^+ in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim. Biophys. Acta* **180**, 1-8.
- Peña, A., Cinco, G., Gómez-Puyou, A. and Tuena, M. (1972). Effect of the pH of the incubation medium on glycolysis and respiration in *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch. Biochem. Biophys.* **153**, 413-425.
- Peña, A., Uribe, S., Pardo, J.P. and Borbolla, M. (1984) The use of a cyanine dye in measuring membrane potential in yeast. *Arch. Biochem. Biophys.* **231**, 217-225.
- Peña, A. and Ramírez, J. (1986) Effects of monovalent cations on derepression of phosphate transport in yeast. *Biochim. Biophys. Acta* **855**, 179-185.
- Roon, R.T., Even, H.L., Dunlop, P. and Larimore, F.L. (1975). Methylamine and ammonia transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* **122**, 502-509.
- Rosas, G., Gómez, F. and Peña, A. (1994). Effect of potassium on amino acid transport in yeast. *Biochim. Biophys. Acta* **1195**, 223-228.
- Sheiness, D. and Sullivan, D. (1986). Staining of RNA in formaldehyde gels. *Focus* **8**, 11-15.
- Thomas, P.S. (1980). Hybridization of denatured RNA and small DNA fragments transferred to nitrocellulose. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **77**, 5201-5205.
- Weislander, L. (1979). A simple method to recover intact high molecular weight RNA and DNA after electrophoretic separation in low gelling temperature agarose

gels. Anal. Biochem. **98**, 305.

Wiame, J-M., Grenson, M. and Arst, H.N. (1985). Nitrogen catabolite repression in yeast and filamentous fungi. *Adv. Microbial. Physiol.* **26**, 1-87.

Table 1. Strains and mutations used in this work

Strain	Genotype	Source
XT300.3A	Wild-type MAT α <i>ade</i> ₂₋₁	Rodríguez-Navarro, A.
21.994b	MAT α , <i>npr1,ura3</i>	Grenson, M.
25.126a	MAT α , <i>npr1,npi1,ura3</i>	Grenson, M.

Table 2. Kinetic parameters of methylamine transport and its inhibition by potassium

Parameter	Control	0.2 mM KCl	1 mM KCl	5 mM KCl
Km1	0.209	0.411	0.189	0.818
Vmax1	0.736	2.45	1.24	2.49
Km2	1.028	3.85	2.896	4.36
Vmax2	3.89	2.27	3.44	1.42

Km and Vmax are expressed as mM and nmol (mg of cells x min)⁻¹, respectively.

Experimental conditions are described in the methods section.

Figure legends:

Figure 1. Effect of preincubation with different potassium concentrations on L-citrulline uptake. Yeast cells from strain XT300.3A were preincubated for 60 min in the presence of 150 mM glucose and with higher K^+ concentrations. Then they were washed and resuspended in the absence of K^+ . 80 μ M L-citrulline was added and after two min samples were used to scintillation counting.

Figure 2. Citrulline uptake by strain XT300.3A. Cells were preincubated in the presence of 150 mM glucose (o) or glucose plus 10 mM K^+ (●). At the indicated times, samples were taken, washed and resuspended without KCl. 80 μ M L-citrulline was added and after two min radioactivity was measured as described in methods.

Figure 3. L-citrulline incorporation to total protein synthesis. Cells were preincubated with glucose (o) or glucose plus 10 mM K^+ (●) in the presence of 80 μ M ^{14}C -Citrulline. At the indicated times, samples were withdrawn and mixed with 1 ml of 10 % trichloroacetic acid. Samples were placed 1 h at 4 °C and the filtered, washed and used for scintillation counting.

Figure 4. Transport activity inhibition after cycloheximide (Cy) addition. Yeast cells were preincubated for 60 min in the presence of 150 mM glucose and 20 mM MES-TEA pH 6.0. At this time the incubation mixture was divided into three fractions, and the following additions were made: 100 μ M cycloheximide (o); 10 mM KCl plus 100 μ M Cy (●) and 10 mM KCl (*). After this, amino acid uptake was followed during 120 min as described in the methods. Panel A: 80 μ M L-citrulline uptake. Panel B: 200 μ M L-leucine uptake.

Figure 5. L-citrulline uptake in the GAP1 reactivation-inactivation mechanism mutants. Yeast cells were preincubated for 60 min in a buffer containing 20 mM MES-TEA, pH 6.0 and 150 mM glucose (C), plus: 10 mM KCl (K⁺), 10 mM NH₄Cl (N) or equimolar concentrations (10 mM) of KCl and NH₄Cl (K+N). 80 μ M L-citrulline was added and after two min, radioactivity was measured as described in methods. Insert: L-citrulline uptake in the wild-type strain XT300.3A.

Figure 6. Potassium and ammonium effects on GAP1 transcription. Before RNA purification, yeast cells from strain XT300.3A were preincubated for different times in the presence of 150 mM glucose (G); 10 mM KCl (K⁺); 10 mM NH₄Cl (N) and equimolar concentrations (10mM) of KCl and NH₄Cl (K+N). GAP1 band size is 2.2 Kb. Actin (1.5 Kb) was used as an internal control for total RNA concentration.

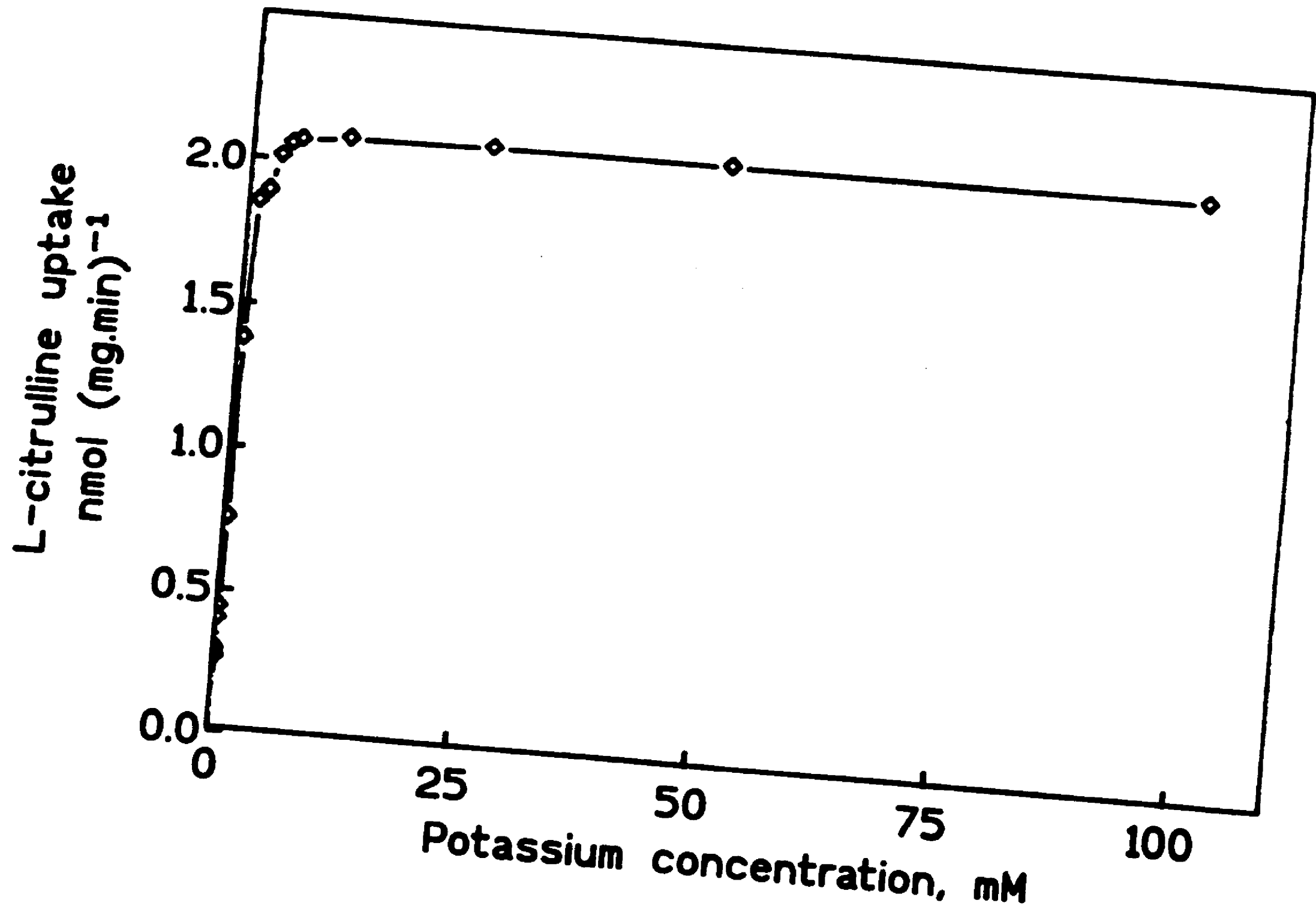


FIGURA 1

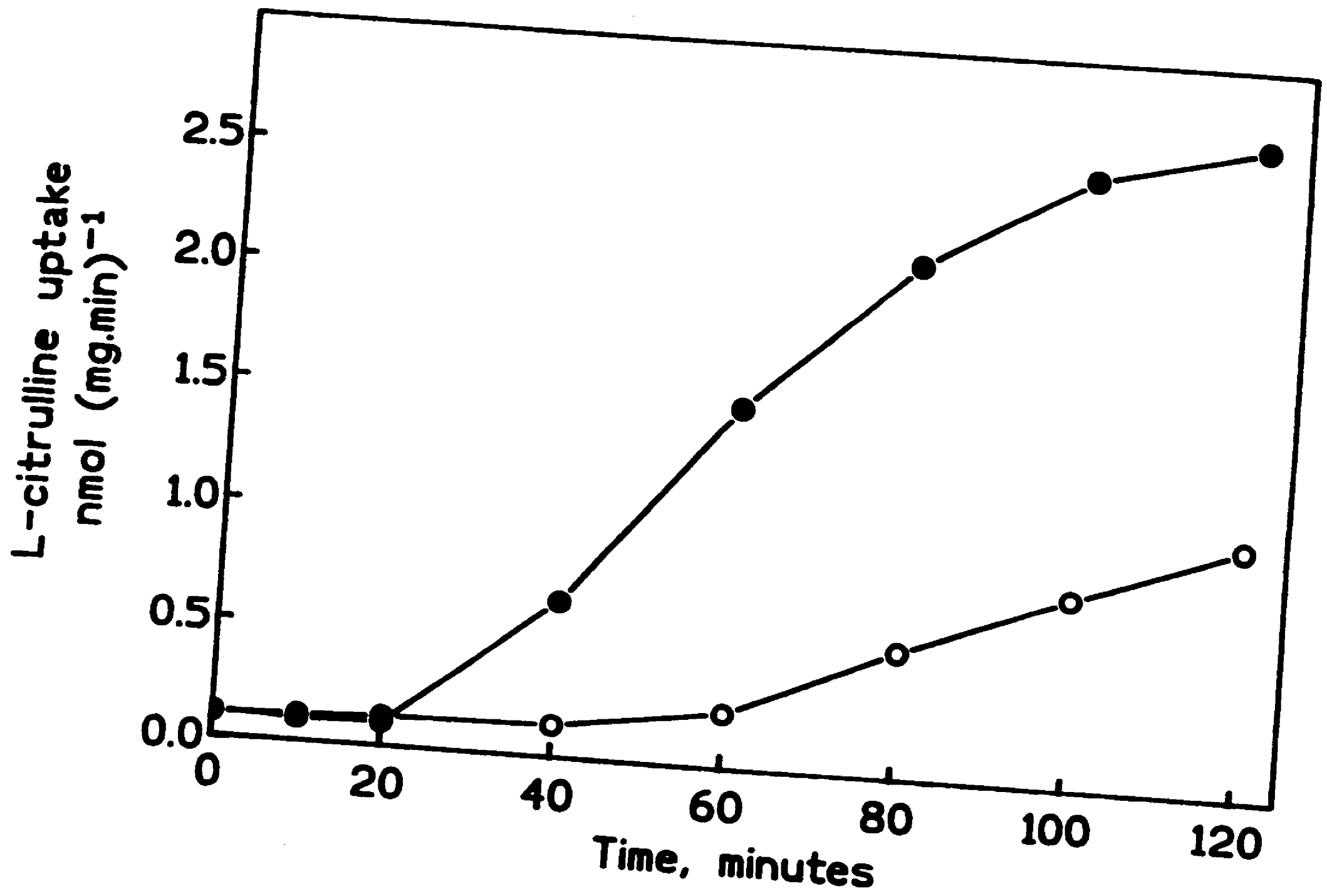


FIGURA 2

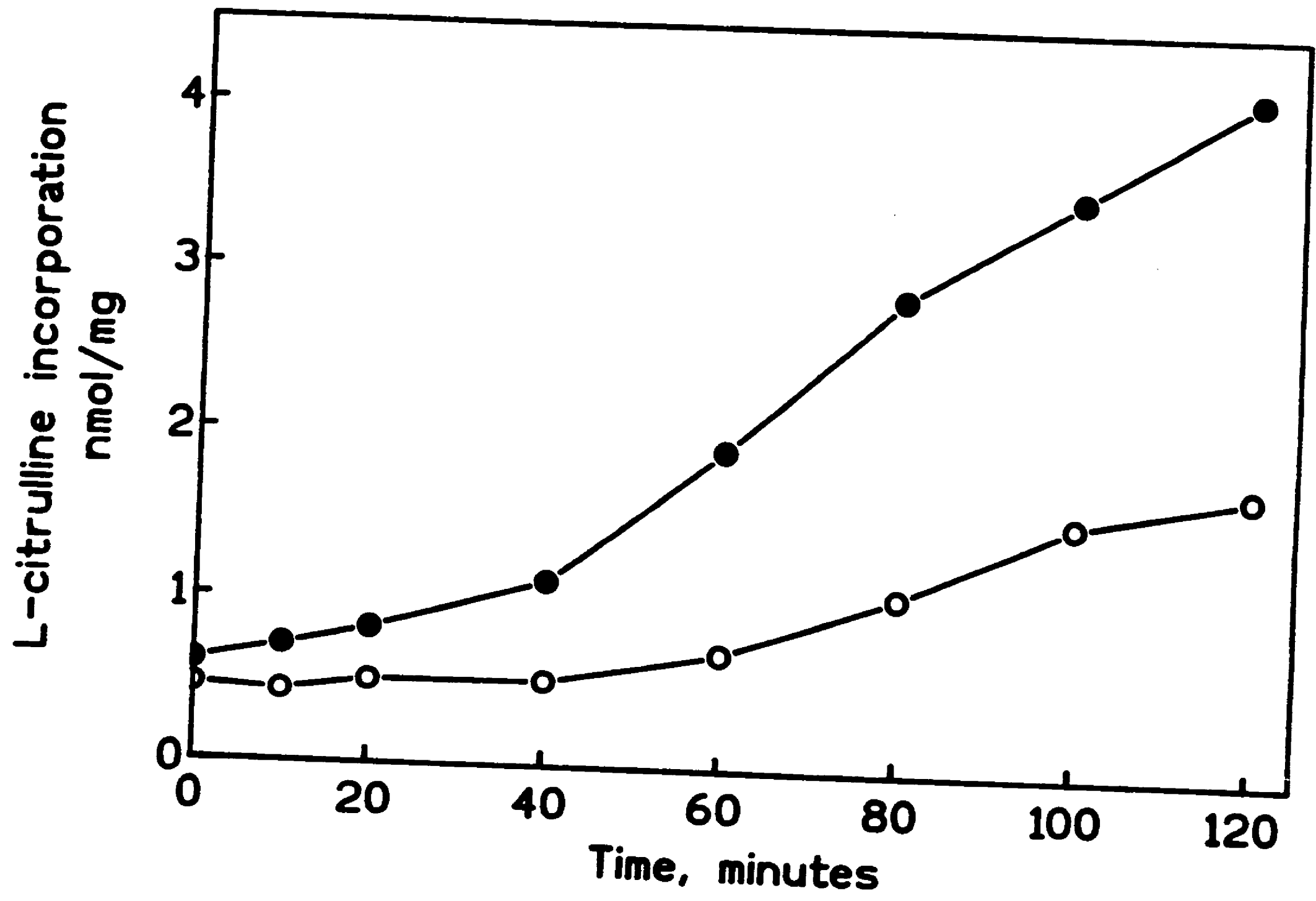
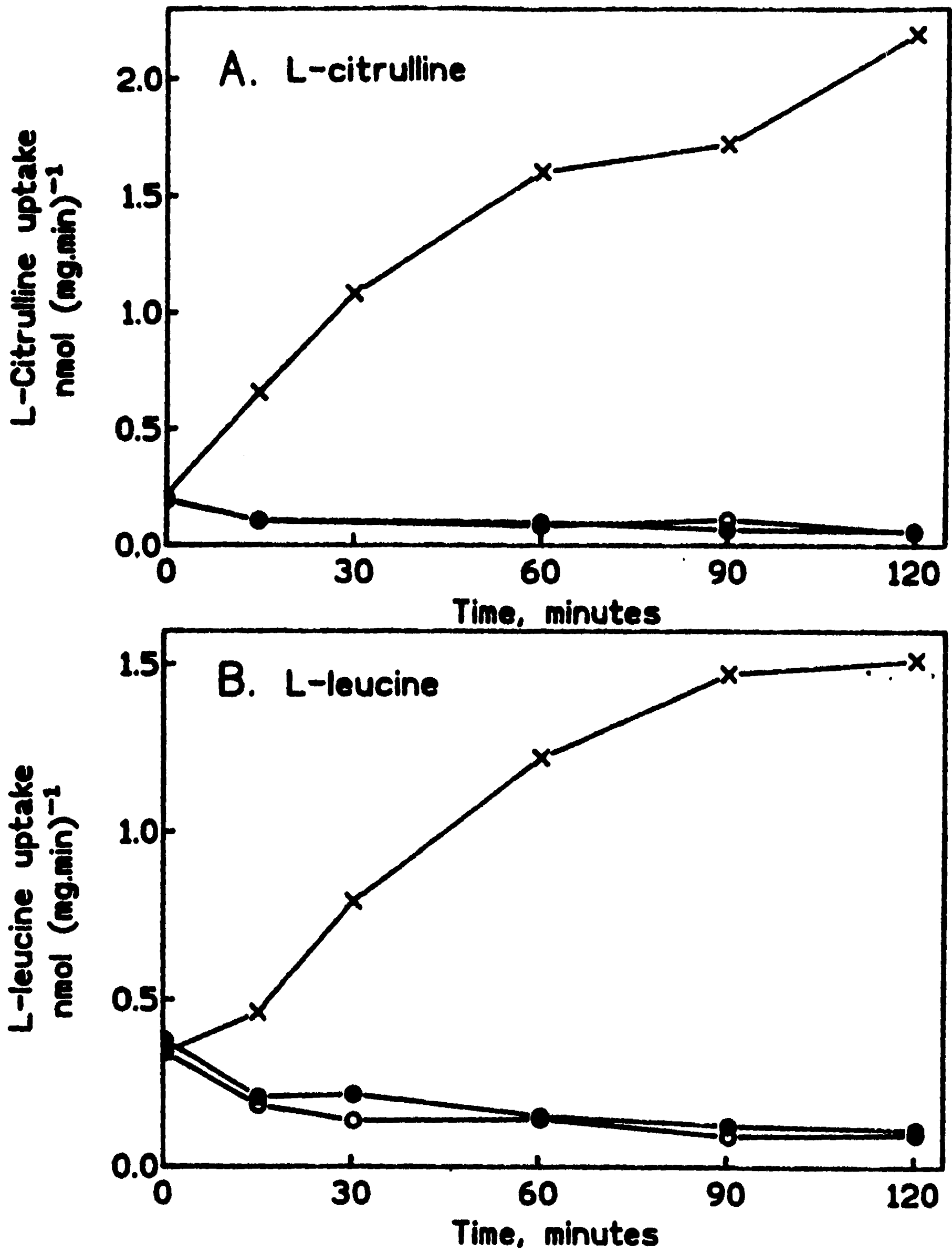


FIGURA 3

FIGURA 4



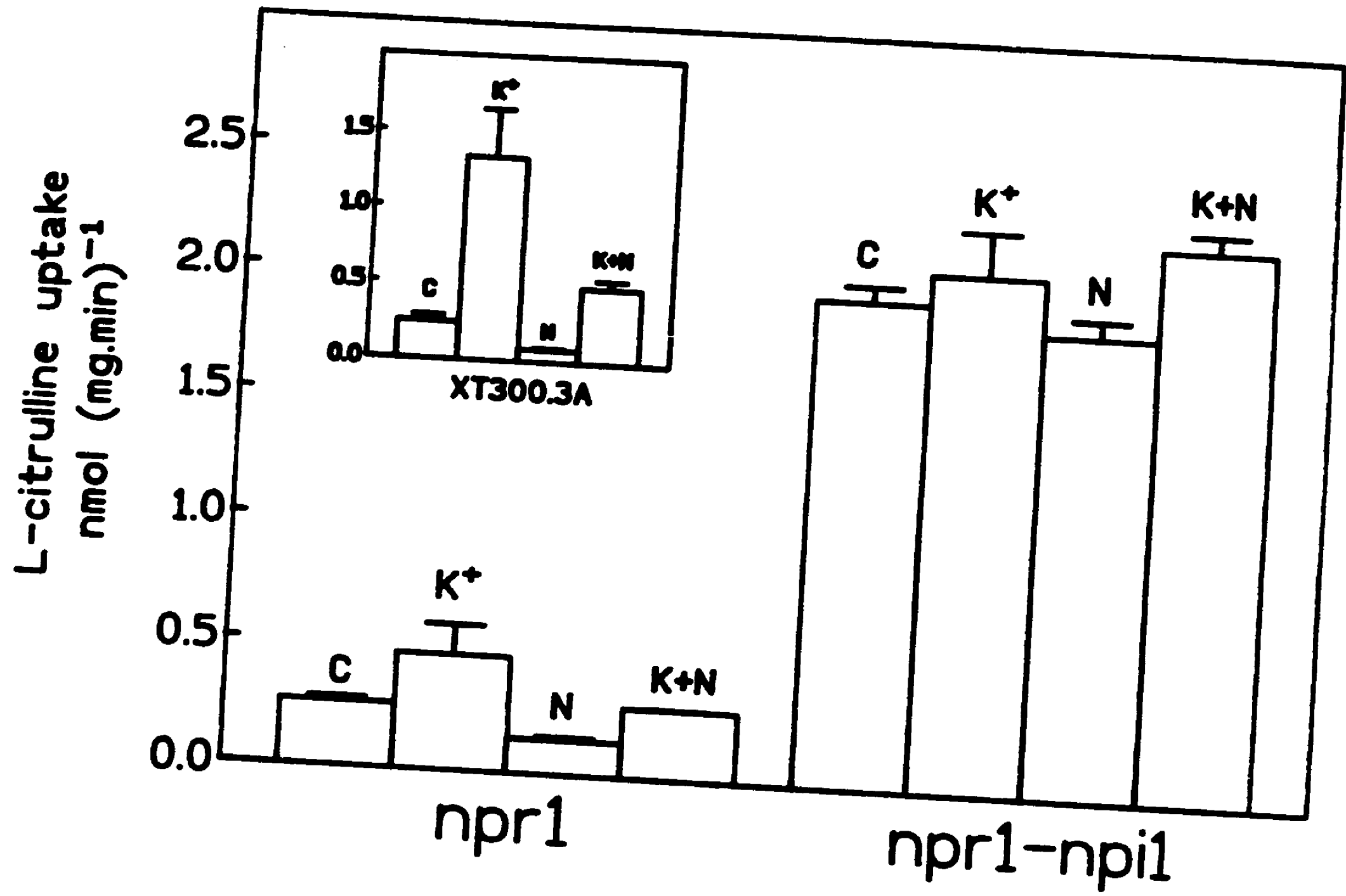


FIGURA 5

FIGURA 6

