

03081

3
29

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

UACPyP del CCH

TRANSPORTE DE
AMINOACIDOS EN
VESICULAS DE
MEMBRANA
PLASMÁTICA
DE *Saccharomyces cerevisiae*

Tesis para obtener el grado de:

Doctor en Investigación Biomédica Básica

Presenta:

MI en CQ MARTHA CALAHORRA FUERTES

México, D.F. 1993.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



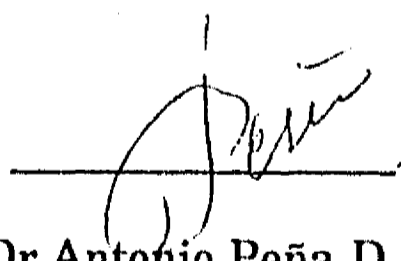
UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

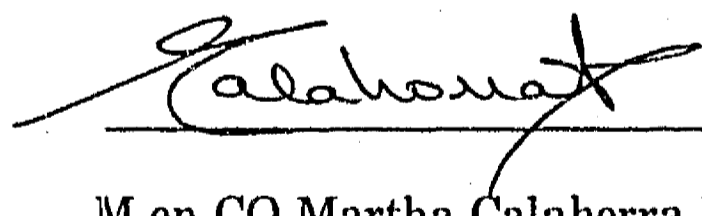
Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

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.

El presente trabajo se desarrolló en el Departamento de Microbiología del Instituto de
Fisiología Celular bajo la dirección del Dr. Antonio Peña Díaz.

A handwritten signature in black ink, appearing to be 'A. Peña', written over a horizontal line.

Dr. Antonio Peña D.

A handwritten signature in black ink, appearing to be 'Martha Calahorra', written over a horizontal line.

M en CQ Martha Calahorra F.

RESUMEN

Se prepararon vesículas de membrana plasmática de levadura de células cultivadas en un medio con prolina como fuente de nitrógeno. En este medio se expresan todos los acarreadores de aminoácidos, a diferencia del medio al que se adiciona amonio como tal inhibe la expresión de muchos de ellos. La membrana se incorporó a dos tipos de liposomas, unos de fosfatidilcolina-fosfatidilserina y otros con lípidos de *E.coli*, ambos contenían citocromo oxidasa de corazón de res como generadora de una fuerza protonmotriz utilizada para el transporte de aminoácidos.

En presencia de valinomicina y potasio predominaba un gradiente de pH y en su ausencia predominaba el potencial de membrana. Al medir transporte de leucina se observó que ambos componentes del potencial electroquímico son importantes.

El transporte de ácido glutámico disminuyó en ausencia de un potencial de membrana, en ambos tipos de vesículas, de lo que se concluyó que el transporte de este aminoácido se necesitan ambos componentes del potencial electroquímico contribuyendo proporcionalmente más el potencial de membrana que el gradiente de pH.

El transporte de arginina en ausencia de un potencial de membrana no se observó, por lo tanto el gradiente de pH parece que no juega un papel importante en el transporte sino mas bien esta mediado exclusivamente por el potencial de membrana.

El transporte de estos aminoácidos se lleva a cabo básicamente a través de la permeasa general y la leucina compitió por la entrada de ácido aspártico y viceversa. Con arginina no hubo competencia, por lo que tal vez este aminoácido esté entrando por un acarreador específico.

SUMMARY

Plasma membrane vesicles were isolated from *S.cerevisiae* cells grown in a medium with proline as nitrogen source. In this medium all the amino acid carriers are expressed, in contrast to the ammonium added medium where the expression of most of them is inhibited. The membrane was incorporated into two kinds of liposomes, one kind was with phosphatidylcholine-phosphatidylserine and the other was made with *E.coli* lipids; both contained beef heart cytochrome oxidase. Cytochrome oxidase was incorporated in order to generate the proton motive force for the transport of amino acids.

In the presence of valinomycin and potassium, where the pH gradient predominated, or under conditions where the membrane potential predominated, leucine was transported. Thus it is concluded that both components of the electrochemical potential were important for the transport of this amino acid.

In the absence of a membrane potential, the transport of glutamic acid is low in either kind of vesicle. This amino acid needed both components of the electrochemical gradient. Perhaps being the membrane potential more important.

Arginine was not transported in the absence of a membrane potential, suggesting that the pH gradient played no role in this transport. The membrane potential seems to be the main source of energy for the transport of arginine.

These amino acids enter mostly through the general permease because there was a competitive inhibition between leucine and aspartic acid for the entrance. This inhibition did not occur with arginine, so arginine might be entering by its own specific carrier.

ABREVIATURAS

Mes	ácido 2-(N-morfolino) etanosulfónico
CCCP	carbonilcianida <i>m</i> -clorofenilhidrazona
TEA	trietanolamina
DiSC ₃ (3)	3,3 dipropilcarbocianina (cianina)
TMPD	N,N,N,N-tetrametil- <i>p</i> -fenilendiamina
EDTA	ácido etilendiamino tetraacético
PMSF	fenilmetilsulfonilfluoruro
NMR	resonancia magnética nuclear

INDICE

	Página
Introducción	1
Los sistemas de transporte	2
Generalidades de los transportadores de los aminoácidos	6
La energización del transporte	8
Las vesículas de membrana	13
Metodología	16
Cultivo de las células	16
Purificación de membrana plasmática	16
Determinación de proteínas	17
Ensayo enzimático	17
Formación de liposomas	19
Incorporación de citocromo oxidasa y formación de vesículas	20
Medida del consumo de oxígeno	20
Medida del transporte de aminoácidos	21
Medida del potencial de membrana	21
Medición del gradiente de pH	22
Resultados	23
Generación de $\Delta\Psi$ y ΔpH	23
Transporte de leucina	25

Efecto del pH	28
Transporte de ácido aspártico	36
Transporte de ácido glutámico	36
Transporte de arginina	36
Especificidad del transporte	39
Efecto de la arginina sobre el $\Delta\Psi$ y ΔpH	39
Efecto del ácido glutámico sobre el $\Delta\Psi$ y ΔpH	44
Efecto de los aminoácidos sobre la actividad de la citocromo oxidasa.	44
Discusión	48
Conclusiones	60
Bibliografía	62

TRANSPORTE DE AMINOACIDOS EN VESICULAS DE MEMBRANA PLASMATICA DE *Saccharomyces cerevisiae*.

INTRODUCCION

Las levaduras poseen una gran versatilidad en cuanto a la utilización de diferentes fuentes de compuestos nitrogenados para su subsistencia. Entre los compuestos nitrogenados se encuentran los aminoácidos, los cuales siguen varios caminos para ser metabolizados por las células. En el primero, después de ser transportados al interior celular, pueden ser incorporados sin modificación alguna, a ciertos constituyentes celulares, como por ejemplo, las proteínas. Los aminoácidos pueden ser degradados por la célula, liberando el nitrógeno que poseen para utilizarlo en la síntesis de otros compuestos nitrogenados. Por último, el esqueleto carbonado también puede ser utilizado por la célula para propósitos sintéticos; en este caso el compuesto nitrogenado está actuando también como una fuente de carbono (1,2).

En *Saccharomyces cerevisiae*, la utilización de las fuentes nitrogenadas ha sido estudiada desde los puntos de vista de transporte, bioquímico, enzimológico y genético. En esta especie de levadura, a diferencia de otras como *Brettanomyces*, *Candida*, *Kloeckera*, *Rodotorula* y *Pichia*, existen aminoácidos que no son utilizados como fuente de nitrógeno, como la lisina, la histidina, la glicina y la cisteína (3).

Los sistemas de transporte

Las levaduras y en general todos los microorganismos eucariotes, presentan una multiplicidad de acarreadores para el transporte de aminoácidos con diferentes grados de especificidad. En general se sintetizan dos clases distintas de sistemas de transporte; el primero muestra especificidad por uno o algunos aminoácidos relacionados químicamente.

A estos acarreadores se les llama también permeasas específicas, de las cuales se han caracterizado 16 cinética y/o genéticamente. Doce de ellas son constitutivas y 4 son adaptativas (4). El otro sistema de transporte, llamado permeasa general de aminoácidos (General Amino acid Permease: GAP), se encarga de la entrada de una variedad amplia de aminoácidos diferentes y transporta todos los aminoácidos básicos y neutros.

Los sistemas de transporte de microorganismos eucarióticos se diferencian de los sistemas análogos de bacterias y de células de mamíferos básicamente en que median un transporte unidireccional del exterior al interior de la célula, y en que son regulados por un mecanismo de retroalimentación conocido como transinhibición (5). La transinhibición consiste en la capacidad de los aminoácidos intracelulares de inhibir la entrada de ellos mismos, o de otros aminoácidos del medio; el grado de inhibición aumenta al aumentar la concentración intracelular del aminoácido. La función de la transinhibición es, aparentemente, la de evitar la entrada masiva y unidireccional de los aminoácidos, lo cual pudiera causar que la célula se lisara (4).

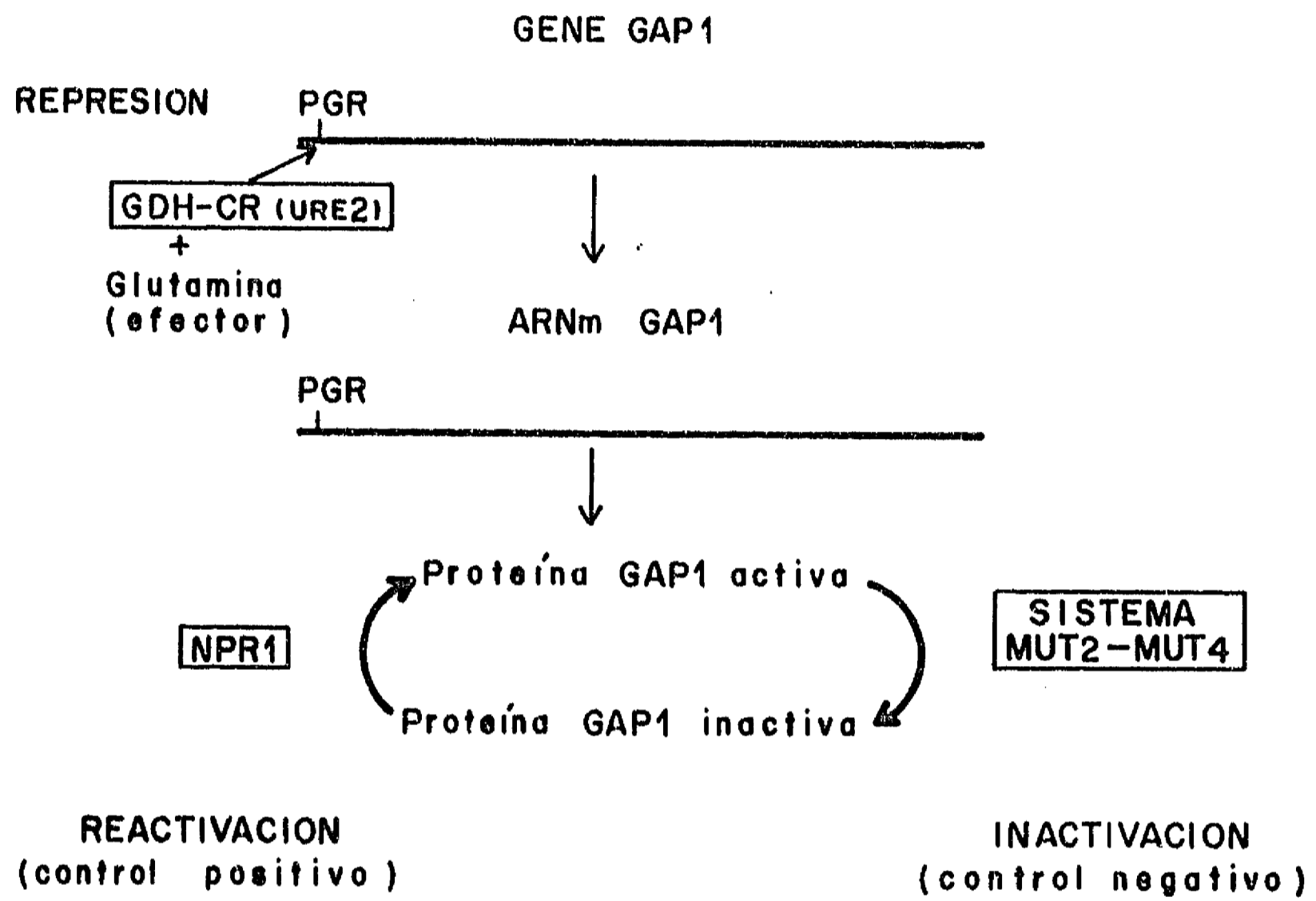
La permeasa general parece estar implicada principalmente en el catabolismo de los aminoácidos, ya que es reprimida si las células se cultivan en presencia de amonio. Esta

inhibición es reversible y ocurre a través de dos mecanismos independientes; ya sea por inactivación de las permeasas presentes en la membrana o por la represión de la síntesis de nuevas permeasas. En éste último caso, Grenson (6) reportó que la actividad de la permeasa general de aminoácidos, requiere de la integridad de dos genes separados, el GAP1 y el NPR1 (Nitrogen Permease Reactivator). Las mutaciones en el GAP1 inactivan específicamente a la GAP1 y parecen afectar al gene estructural de esta permeasa (6,7). Las mutaciones en el gen NPR1 afectan a distintas permeasas sensibles al amonio, e inactivan completamente a la GAP1. La proteína codificada por el gene NPR1 es necesaria para la reactivación de la proteína GAP1. Esta proteína es inactivada continuamente por un proceso regulador que es a su vez mediado por el producto de dos genes no ligados llamados MUT2 y MUT4 o también llamados NPI1 y NPI2 (Nitrogen Permease Inactivator) respectivamente. Dentro del gene GAP1 existe un sitio llamado PGR, que es un sitio receptor donde actúa continuamente un control negativo de los productos de MUT2 y MUT4.

El producto del gene NPR1 parece ser responsable ya sea de proteger a la permeasa contra el proceso de inactivación, o de catalizar un efecto de reactivación. Se cree que amonio actúa inactivando a NPR1, o activando a MUT2 y MUT4.

Cuando las levaduras se cultivan en un medio con prolina se alcanza un balance entre el efecto negativo del sistema MUT2-MUT4 y el efecto positivo del producto del gene NPR1. Si a este cultivo se le adiciona iones amonio, la permeasa se inactiva progresivamente por el sistema MUT2-MUT4.

Además de la regulación por inactivación-reactivación de la GAP1, parece haber un segundo mecanismo de regulación que reprime la síntesis de la permeasa en levaduras



Regulación de la permeasa general de aminoácidos [tomado de Grenson 1983 (90)]

cultivadas en un medio con amonio (8). Esta represión parece estar mediada por el producto del gene GDHCR (Glutamate Deshidrogenase Catabolic Represor) que inhibe, la transcripción del gene GAP1 y de todas las enzimas y proteínas que se encuentran sujetas a represión catabólica del nitrógeno, el procesamiento de la proteína, o la traducción del ARN_m de GAP1. El producto del gene GDHCR incluso puede afectar la modificación postraduccional necesaria para producir una proteína GAP1 activa. Recientemente Jauniaux y Grenson (9) encontraron que probablemente el control de la síntesis de la permeasa general se ejerza al reprimir la transcripción del ARN_m.

En *Saccharomyces ellipsoideus* se ha reportado que el amonio inhibe el transporte de la leucina (10), y en las bacterias fijadoras de nitrógeno, disminuye la entrada de todos los aminoácidos (11). Es posible que el amonio inhiba, además de la permeasa general, a una gran cantidad de permeasas, tanto en las levaduras como en otros microorganismos.

Se sabe que la permeasa general es capaz de transportar a todos los aminoácidos incluyendo al glutamato, al aspartato (12) y a la prolina (13).

A diferencia de los otros sistemas de transporte de aminoácidos, la permeasa general se encuentra bien caracterizada; antes se pensaba que constaba de 3 polipéptidos de peso molecular de 53,000, 45,000 y 30,000, además de una proteína periplásmica de 14,000 D, asociada a ella laxamente (14); actualmente se ha deducido su secuencia de aminoácidos a partir del gene y se ha observado que consta de un solo polipéptido de 65,578 D por lo que se sugiere que pertenece a la clase de una sola proteína transportadora que media tanto el reconocimiento del sustrato como su translocación, como se ha demostrado para la β galactosido permeasa de *E.coli* (9).

Generalidades de los transportadores de los aminoácidos

Para la gran mayoría de los aminoácidos se ha encontrado dos sistemas de transporte, uno de alta y otro de baja afinidad; este ha sido el caso de la lisina (15,16,17), la histidina (16), la metionina (16,19), la glicina (14,20,21,22,23) y la prolina (13,24,25).

En el caso de la leucina, Bussey y Umbager (26) fueron los primeros en demostrar la existencia de un transportador específico en *S.cerevisiae* con un valor de K_t de $30\mu\text{M}$ y en el que tanto la isoleucina como la valina lo inhibían competitivamente. Subsecuentemente, Kotyk (16) y Ramos y cols. (27) identificaron dos componentes para la entrada de leucina en *S.cerevisiae*, uno de baja afinidad (K_t de 2.0-4.5 mM) y otro de alta afinidad (K_t de $84\mu\text{M}$) y sugirieron que el sitio de alta afinidad era la permeasa general. En protoplastos se observó lo mismo (28), lo cual indicaba que la pérdida de la pared celular no parecía afectar los parámetros cinéticos.

Calderbank (19) encontró que el transporte de la leucina no obedece a los modelos descritos por Michaelis-Menten para dos sistemas de transporte, y sugirió que la entrada de este aminoácido implica un proceso que opera totalmente separado o en conjunción con otro sistema de transporte que sí obedece a la cinética de Michaelis-Menten.

Para el transporte de arginina y lisina (29) se encontró una proteína periplásmica de 5,000 D, capaz de unir a estos aminoácidos, y necesaria para el transporte. Sin embargo, la importancia de esta proteína es dudosa, ya que tanto las cepas mutantes en este transporte como la cepa silvestre sintetizaban esta proteína en cantidades iguales.

Con el transporte de arginina, se encontró un acarreador de alta afinidad con una K_t

de 10 μ M y que era inhibido competitivamente por la lisina, la ornitina y la canavanina (15); por ello se pensó que era un transportador específico de aminoácidos básicos. Posteriormente se identificaron dos componentes para el transporte de arginina en *S.cerevisiae* (30,31) encontrándose además del transporte de alta afinidad descrito por Grenson, uno de baja afinidad (K_t de 1mM). Keenan y Rose (31) reportaron que en células cultivadas en ácido oleico existe una mayor afinidad para la acumulación de arginina, encontrando un componente de alta afinidad con una K_m de 2×10^{-5} M y V_{max} de 2 nmol/min/mg y uno de baja afinidad con una K_m de 2.1×10^{-2} y V_{max} de 37 nmol/min/mg. Si las células se cultivan en ácido linoleico, las constantes cambian a K_m de 1.3×10^{-3} y V_{max} de 5.5 nmolas/min/mg y una K_m de 9.2×10^{-2} y V_{max} de 220 nmolas/min/mg, respectivamente. De estos datos se concluyó que el transporte se altera en presencia de las dobles ligaduras en los ácidos grasos, tal vez por que había mayor fluidez; y que el sistema de alta afinidad requiere residuos monoinsaturados. Por esta razón, estos autores encontraron además del transporte de alta afinidad descrito por Grenson, uno de baja afinidad.

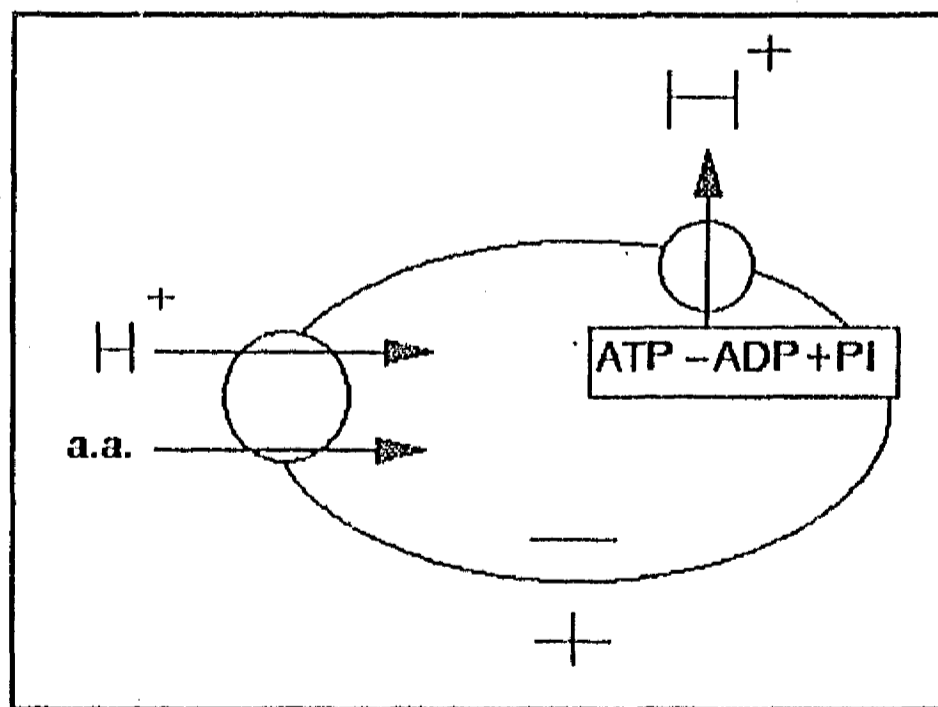
En el caso de los aminoácidos dicarboxílicos, se describen también dos sistemas de transporte relativamente específicos. Para el glutamato se identificaron tres sistemas de transporte; uno de ellos es la permeasa general. Ninguno de los otros dos se caracterizó cinéticamente (12,16). En 1984, Calderbank describió a los sistemas para el transporte del glutamato, encontrando para el de alta afinidad una K_t de 20 μ M y para el de baja afinidad una K_t de 3.3mM (19).

A pesar de que los sistemas de transporte de aminoácidos en *S.cerevisiae* parecen operar independientemente unos de otros, al menos desde el punto de vista cinético, existen

algunas evidencias que sugieren que algunos de ellos comparten elementos comunes (2). En general existe una gran controversia en cuanto al número y tipo de transportadores, y parece ser que depende de las condiciones de crecimiento de las células, así como de su estado metabólico.

La energización del transporte

El transporte de los aminoácidos depende de la energía que se obtiene de la hidrólisis del ATP; en la membrana de la levadura hay una ATPasa que bombea protones al exterior. Esta enzima ya ha sido bien caracterizada, purificada, reconstituida y su gen ha sido secuenciado y clonado, no sólo de *S.cerevisiae* (32,33,34), sino también de otros hongos, como *Neurospora crassa* (35,36) y *Schyzosaccharomyces pombe* (37).



Esquema del mecanismo general de la hidrólisis de ATP y transporte de aminoácidos.

La ATPasa es capaz de transportar electrogénicamente protones al medio externo al hidrolizar ATP; estos protones expulsados generan un potencial electroquímico, el cual es aprovechado por diferentes acarreadores para transportar hacia el interior celular diversos metabolitos como Ca^{++} , K^+ , fosfato, azúcares y aminoácidos (38,39,40,41,42,43,44).

La entrada de metabolitos se puede llevar a cabo en un cotransporte con protones, mediante un sistema simportador, como en el caso de los aminoácidos, azúcares y fosfato; o mediante un sistema uniportador, como el que se propone para el K^+ (45,46).

El potencial electroquímico de la levadura está dado por una distribución desigual de protones y otros iones a través de la membrana, que es esencialmente impermeable a ellos. El potencial resulta del establecimiento de una diferencia de las cargas eléctricas internas y externas, que se conoce como potencial de membrana ($\Delta\Psi$), y de un componente químico, conocido como gradiente de protones (ΔpH). La fuerza protonmotriz comprende ambos valores y se calcula con la siguiente ecuación:

$$\Delta p = - 2.3 \frac{R T}{F} \cdot \Delta \text{pH} + \Delta \Psi$$

si se toman en cuenta las constantes y se hace el cálculo a 30°C , la ecuación se reduce a:

$$\Delta p = \Delta \Psi - 60 \Delta \text{pH}$$

En cuanto a la energización específica en el caso del transporte de los aminoácidos por la permeasa general, ha habido una investigación extensa, sobre todo por Eddy (20). Este autor propuso que el transporte de glicina se lleva a cabo mediante el cotransporte con H^+ , a raíz de que en las levaduras del género *Saccharomyces*, con el metabolismo limitado

por inhibidores de la glucólisis y la respiración, la entrada de leucina, lisina, fenilalanina, glicina y aminoisobutirato, era mayor a pH 4.5 que a pH 7.5, y la entrada iba acompañada por 1 o 2 equivalentes de H^+ y de 3 equivalentes en el caso del glutamato (41,47,48). En estos mismos trabajos se observó que, junto con la entrada de H^+ que acompaña la captura del aminoácido, es posible observar un flujo de K^+ , y se llegó a la conclusión que en levaduras carentes de "energía metabólica", la entrada de los aminoácidos se lleva a cabo por cotransporte con H^+ , y la entrada de carga eléctrica se balancea mediante la salida de K^+ , por lo que si este catión agregado al medio de incubación produce inhibición de la entrada de aminoácidos. Sin embargo, Peña (49) demostró que al adicionar K^+ a la levadura que se encuentra a pH bajo, se acelera la hidrólisis del ATP y el bombeo de protones, y se alcaliniza el medio interno. Cuando se preincuba a las levaduras con K^+ , el proceso favorece la entrada de aminoácidos y no la inhibición como observó Eddy. De la Peña (50) también demostró que el $\Delta\mu_{H^+}$ a pH externo de 4.5 es de -150 mV y a pH externo de 7 es de -90 mV. Al adicionar 200 mM de K^+ en el medio, hay un incremento del ΔpH a pH 4.5 de -105 mV a -111 mV y a pH 7 de -17 mV a -35 mV, pero como el $\Delta\Psi$ disminuye, se obtiene una disminución del $\Delta\mu_{H^+}$ de un 15%. Un problema de estos experimentos es que 200 mM de K^+ es una concentración muy alta, sin embargo, a concentraciones más bajas, el potencial electroquímico de protones también disminuye.

En los mismos experimentos de Eddy, cuando las levaduras disponían de energía los efectos del pH o del K^+ sobre el transporte de glicina no eran tan claros (20), por lo que se concluyó que con energía suficiente, la célula expulsa inmediatamente por la ATPasa los H^+ que entran. Sin embargo, no se demostró que se acelerara el bombeo de protones, ni que se

acidificara el interior de la levadura. Es necesario, sin embargo, tomar en cuenta que el transporte de aminoácidos sí se inhibe cuando se agrega simultáneamente potasio al medio, pero esto puede deberse a que este catión disminuye el potencial de membrana de la levadura (51).

Retomando estos trabajos, Ballarin-Denti y cols. (22) estudiaron el influjo de protones y eflujo de K^+ durante el transporte de glicina en *S.cerevisiae*. Se encontró que existe una acumulación de aminoácidos independiente de energía, que es 100 veces menor que en las células con energía. A un pH externo de 4.5 hay acumulación del aminoácido, ya que el pH interno de la levadura es 6.5, y el gradiente de pH favorece termodinámicamente el transporte; esto no sucede cuando el pH externo es 7.5. Cuando se adicionaba glicina a células "carentes de energía", estos autores observaron una salida de K^+ y entrada de H^+ con una estequiometría de aminoácido/protón/potasio de 1:1:1, diferente de la estequiometría observada por Eddy de 1:2:2, respectivamente. Se calculó el pH interno mediante NMR de ^{32}P y se obtuvo un valor de 6.6-6.9 y una estequiometría de Gli/ H^+ de 1:1. Cambiando el pH interno y graficando contra el transporte a un pH externo constante de 5.7, la estequiometría fue de 1:3. Cuando se graficaron los cambios en el pH externo contra el transporte a un pH interno constante de 6.7 la estequiometría es de 1:1. En las células con metabolismo normal no se observaron cambios en los flujos de H^+ o K^+ al adicionar glicina. El pH interno calculado para éstas células fue de 7.2-7.4.

Los trabajos de Ohsumi y Anraku (52) sobre transporte de aminoácidos en vacuolas de levadura coinciden con la hipótesis de Eddy, pero hay resultados que no encajan en dicho esquema al estudiar el efecto de los cationes. Kotyk reportó que ni el Na^+ ni el K^+ participan

en el transporte de aminoácidos (53). Resultados obtenidos en el laboratorio, estudiando el transporte de leucina en *S.cerevisiae*, indican que en células sin energía metabólica, con o sin la adición de inhibidores de la glucólisis y la respiración, la entrada de leucina no es mayor a pH bajo que a pH alto (54). También se ha observado que el K^+ juega un papel complejo en el transporte de aminoácidos, aumentando la captación después de 1 hr de preincubación de las células en presencia de este catión. Este incremento no puede explicarse únicamente en términos de la neutralización de la carga eléctrica neta de la membrana. Kotyk (55) encontró que el $\Delta\psi$ se forma de inmediato y tiene poca variación conforme transcurre el tiempo, por lo que el aumento del transporte de K^+ no es por cambios en el $\Delta\psi$, sino probablemente por un aumento en la cantidad de acarreadores; lo mismo se reportó para el transporte de sulfato (56). Sin embargo, el cambio del pH interno, cuando se incuban levaduras en presencia de potasio, no es inmediato, ya que tarda alrededor de 30 minutos (49).

Este conjunto de resultados contradictorios nos llevó a estudiar el transporte de diferentes aminoácidos como la leucina, la arginina y el ácido aspártico en vesículas de membrana plasmática de *S.cerevisiae* en las cuales el metabolismo ya no es un factor que afecte el transporte. En las vesículas también se puede controlar tanto el medio interno como el externo, y estudiar las características cinéticas del transporte de aminoácidos en función del estado metabólico de las levaduras. No debe pensarse en términos de modelos cinéticos rígidos, sino más bien en esquemas sujetos a mecanismos regulatorios de diversa índole. No se tiene respuesta a muchas preguntas concernientes a la fisiología, ni a los mecanismos moleculares, en particular por razones metodológicas, ya que los flujos de

solutos acoplados a los de H^+ se deducen de la alcalinización del medio externo. Aún no hay métodos suficientemente sensibles para medir la acidificación interna de la célula, ya que los factores metabólicos producen gran incertidumbre en la medida de los flujos de H^+ . Para poder medir esto se necesita controlar tanto el pH interno como el externo, lo cual es posible al trabajar con vesículas de membrana. Otra información que no existe para la levadura, es si los transportadores de los aminoácidos son semejantes para los acídicos, los neutros y los básicos; en especial en este aspecto, y en relación con los básicos, creemos contar con información interesante derivada de los experimentos con las vesículas.

Las vesículas de membrana

La utilidad del uso de vesículas de membrana plasmática para los estudios de transporte se ha demostrado ampliamente, sobre todo en sistemas epiteliales o en otros tipos de células animales. Sin embargo, en los hongos, solamente en el caso de *Neurospora crassa*, cuya membrana se vesicula fácilmente, se habían podido realizar estos estudios (57,58,59). En el caso de las levadura, especialmente *Saccharomyces cerevisiae*, había sido difícil obtener preparaciones de vesículas selladas (60,61,62). Finalmente, Franzusoff y Cirillo (60) lograron una preparación mixta, fusionando vesículas de fosfolípidos con membranas de levadura.

Una manera de comprobar que las vesículas se encuentran selladas es determinando si son capaces de generar y mantener un potencial de membrana y un gradiente de pH. Para

medir los gradientes transmembranales se han utilizado métodos indirectos, como la determinación de la distribución de cationes lipofílicos como el tetrafenilfosfonio (TPP⁺) y el trimetilfenilfosfonio (TMPP⁺), los cuales se equilibran de acuerdo con el potencial de membrana por su carga y por su transporte pasivo a través de la membrana (62). También se han utilizado los colorantes fluorescentes para la detección y medición del potencial (63, 64,65) y para el gradiente de pH (59, 66-69).

El objetivo principal de esta tesis fue estudiar el papel que juega el gradiente electroquímico o fuerza protón-motriz en el transporte de aminoácidos, para ver si éste depende del potencial de membrana y/o el gradiente de pH. Los datos obtenidos contribuirían a lograr una visión mas clara de los sistemas de transporte de *Saccharomyces cerevisiae*.

En distintos tipos celulares el papel que juegan el $\Delta\Psi$ y el ΔpH es diferente. En la bacteria fotosintética *Chromatium vinosum*, el potencial de membrana es el principal contribuyente en el transporte de los aminoácidos (69), y en un bacilo alcalófilo, el transporte de leucina también está energizado en un 100% por el potencial de membrana (70). En contraste, en *Streptococcus cremoris*, ambos componentes del potencial electroquímico son importantes, en diferentes proporciones, dependiendo del aminoácido transportado (71). Parece que en las levaduras ambos componentes son importantes, cada uno en diferente grado, dependiendo de las condiciones metabólicas en que se encuentre la célula.

El tratamiento previo a que se someten las levaduras es un factor importante en la expresión, tanto de la permeasa general como de los acarreadores específicos, debido a la

alta capacidad de adaptación que tienen las levaduras a medios ambientes cambiantes, ya que las levaduras hacen uso de una serie de señales diferentes para aumentar el transporte de diversos metabolitos. Para controlar la expresión de transportadores se cultivaron a las levaduras en el medio óptimo para aumentar el transporte y de ahí obtener la membrana plasmática para formar las vesículas.

METODOLOGIA

Cultivo de las células.

La levadura *Saccharomyces cerevisiae* de la cepa DC XII, donada por M. Opekarová (Institute of Microbiology Czechoslovak Academy of Science), se cultivó durante 20 hrs a 30°C bajo agitación continua en un medio descrito por Opekarová y cols (29). El medio contiene 2 g/l de KH_2PO_4 , 1 g/l de K_2HPO_4 , 0.3 g/l de citrato de Na, 0.1 g/l de MgCl_2 , 0.1 g/l de MnSO_4 , 0.1 g/l de CaCl_2 , 0.1 g/l de ZnSO_4 , 3 g/l de extracto de levadura y 50 mM de glucosa; pH 5.5-6. La única diferencia con el medio original consistió en que se adicionó 2 mg/ml de prolina, en lugar de amonio, a fin de evitar la inactivación que éste produce sobre los sistemas de transporte (6).

Purificación de la membrana plasmática.

Las células se colectaron del medio de cultivo por centrifugación a 3000 rpm durante 5 min. y se lavaron dos veces con agua desionizada; después se siguió el método de purificación descrito por Franzusoff y Cirillo (60) con algunas modificaciones. La técnica consistió en lavar las células con un amortiguador que contenía 0.25 M de sacarosa, 10 mM

de imidazol, 1 mM de EDTA, 2 mM de mercaptoetanol, 1 mM de PMSF y 0.02 % de NaN_3 a pH 7.4. Las células se resuspendieron en este mismo amortiguador (8 gr peso húmedo en 40 ml) y se rompieron con perlas de vidrio de 0.25-0.3 mm en un homogeneizador de células (B. Braun melsungen A. G.) enfriado con CO_2 , durante 90 seg en lotes de 20 ml. Se llenó la mitad del homogeneizador con perlas de vidrio y lo demás de células. Una vez rotas todas las células, se decantó la suspensión final para quitar las perlas y el líquido se sometió a una serie de centrifugaciones diferenciales, alternado con sonicaciones en un sonicador de baño, cambios de pH, congelación en un baño de hielo seco-acetona y descongelación en un baño de agua a temperatura ambiente (fig.1). En la última centrifugación las membranas se resuspendieron en 10 mM de Tris/HCl pH 7.0 y se guardaron en nitrógeno líquido.

Determinación de proteínas.

La proteína se determinó mediante la técnica de Lowry (72) utilizando albúmina de suero bovino como estándar.

Ensayo enzimático.

La determinación de la actividad de la ATPasa en la preparación de la membrana plasmática se midió por la detección colorimétrica del fosfato inorgánico liberado, utilizando

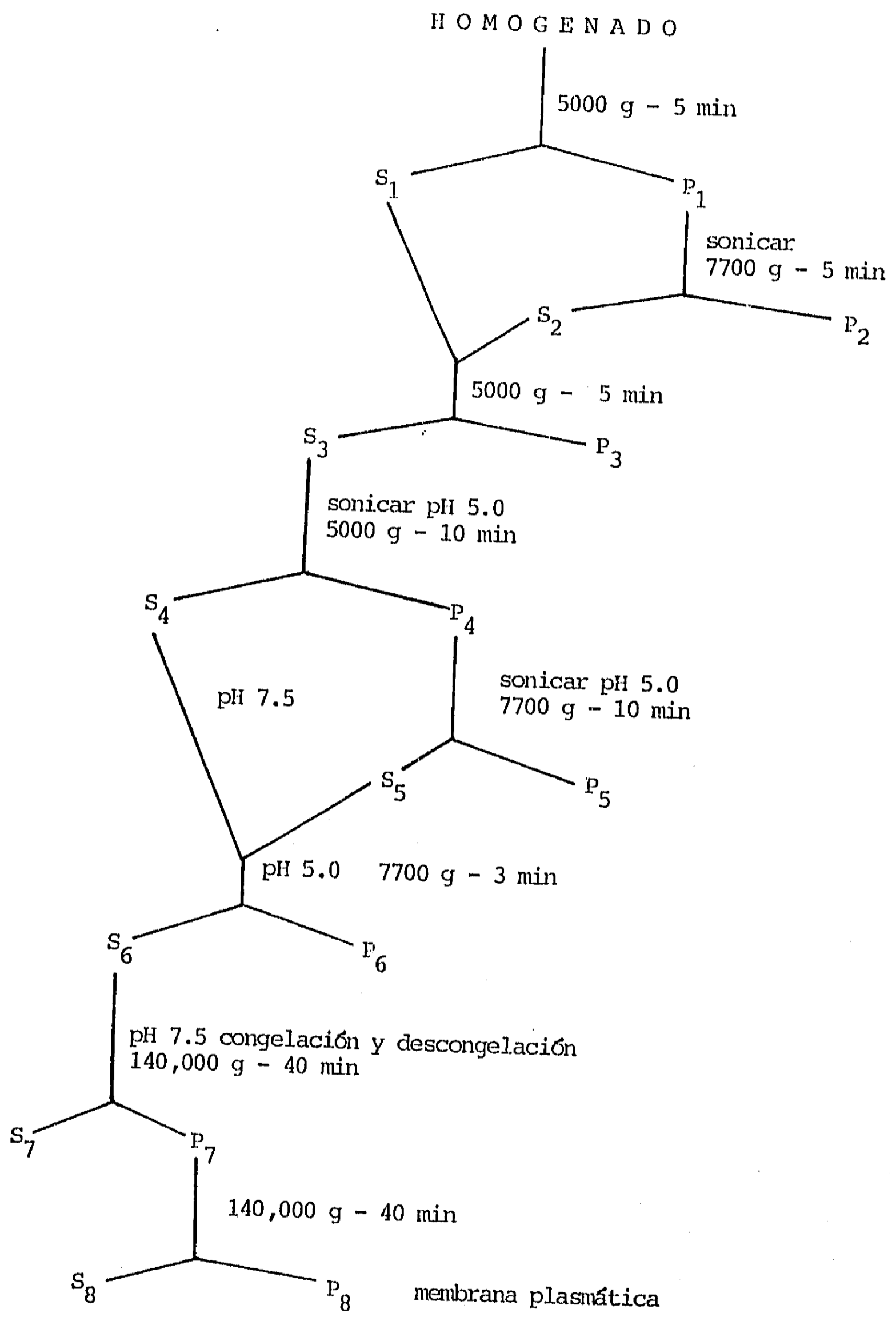


Fig.1.- Esquema de la purificación de la membrana plasmática

una modificación del método de Fiske y Subbarow (73). La reacción se inició agregando la membrana (10-20 μ gr de proteína) a 350 μ l del medio, que contenía 50 mM de MES, 50 mM de H_3PO_4 /TEA pH 7.0, 2,6 mM de $MgCl_2$ y 8 mM de ATP, y se incubó a 30°C durante 10 min. La incubación se detuvo con la adición de una solución que contenía 12 gr de molibdato de amonio, 28 ml de H_2SO_4 , 40 gr de SDS cbp 1 lt de agua y 250 μ l de ELON. Se preparó un estándar de fosfato para cada ensayo. Después de 15 min se leyó la reacción a una longitud de onda de 700 nm en un espectrofotómetro Shimadzu UV 160A.

Formación de liposomas.

Se prepararon liposomas de fosfatidilcolina de soya (Sigma Chem. Co.) 30 mg/ml y fosfatidilserina (Avanti Chem.) 1 mg/ml en un amortiguador 5 mM de MES/TEA, 5 mM de H_3PO_4 pH 7.0, con o sin 50 mM de KCl según se requirió, sonicándose a claridad, generalmente 15 seg., en un sonicador de vástago (Branson Sonic, modelo B 12). A estos liposomas se les denominó PC-PS.

También se prepararon liposomas con fosfolípidos extraídos de *E.coli* (Sigma Chem Co.) 33.3 mg/ml, en el mismo amortiguador y por el mismo procedimiento. A estos liposomas se les llamó PE debido a que el 65% de los lípidos son fosfatidiletanolamina.

Incorporación de citocromo oxidasa y formación de las vesículas.

A los liposomas PC-PS se les incorporó por dilución (74) la citocromo oxidasa purificada de corazón de res, a una concentración de 29 $\mu\text{g/ml}$. Después se adicionó membrana plasmática a una concentración de 1 mg/ml ; se congelaron en un baño de hielo seco-acetona y se descongelaron a temperatura ambiente, dos veces. Posteriormente se sonicaron en un sonicador de vástago (modelo B 12) hasta claridad, generalmente 15 seg.

A los liposomas PE se les incorporó la citocromo oxidasa por diálisis del detergente octilglucósido según se indica en la técnica de Van Leewen (75), quedando 33.3 mg/ml de lípido y 2 mg/ml de citocromo oxidasa. La membrana plasmática (1.6 mg/ml) se incorporó de la misma manera que en los liposomas PC-PS en una relación de 20:1 lípido proteína respectivamente.

Medida del consumo de oxígeno.

El consumo de oxígeno de la citocromo oxidasa se midió polarográficamente con un electrodo de oxígeno de Clark (Yellow Springs Instruments) conectado a un graficador. Se adicionaron 40 μl (60 μg de proteína) de vesículas con citocromo oxidasa incorporada a 3 ml de amortiguador 5mM de MES, 5 mM de $\text{H}_3\text{PO}_4/\text{TEA}$ pH 7.0 y 150 μg de citocromo c. La reacción se inició adicionando 5 mM de ascorbato, 5 μM de TMPD a pH 7.0. Cuando se

indica, se desacopló adicionando 3 μM de CCCP.

Medida del transporte de aminoácidos.

El transporte de aminoácidos se midió a 30°C adicionando 700 μl de vesículas (600 μg de proteína en las vesículas PC-PS y 500 μg en las PE) a un volumen final de 1 ml de amortiguador (5 mM de MES/TEA, 5 mM de H_3PO_4 pH 7.0). La reacción se inició adicionando el aminoácido radioactivo, ya sea ^3H leucina 50 μM (act. esp. 79 $\mu\text{Ci}/\mu\text{mola}$), ^3H arginina 10 μM (act. esp. 873 nCi/nmola), ^3H ac. aspártico 50 μM (act. esp. 149 nCi/nmola) o ^{14}C ácido glutámico 100 μM (act. esp. 49 $\mu\text{Ci}/\mu\text{mola}$). Al minuto de haber adicionado el aminoácido se agregó el sustrato de la citocromo oxidasa que contenía 50 mM de ascorbato, 50 μM de TMPD y 34 μg de citocromo *c*. A diferentes tiempos se tomaron alícuotas de 100 μl que se filtraron inmediatamente en filtros de 0.3 μm de nitrocelulosa (Millipore) y se lavaron con 5 ml de 50 mM de LiCl frío. Los filtros se dejaron secar y se transfirieron a viales con líquido de centelleo, que se contaron en un contador Packard Tri-Carb 300.

Medida del potencial de membrana.

La formación del potencial de membrana en las vesículas se estimó por el apagamiento de la fluorescencia de la dipropiltiocarbocianina $\text{DiSC}_3(3)$ a las longitudes de

onda de 540-590 nm (51). Estas longitudes de onda no corresponden a los máximos de excitación y emisión de la cianina, pero se utilizaron para evitar la dispersión de luz que puede observarse si se utilizan los máximos, que son muy cercanos.

Las vesículas (20 μg de proteína de membrana) se adicionaron a una celdilla con 5 mM de MES/TEA, 5 mM de H_3PO_4 pH 7.0, en un volumen final de 2.0 ml, que contenía 250 nM de cianina. Se inició la reacción adicionando el sustrato, ascorbato 5 mM, TMPD 5 μM y 3.4 μg de citocromo c. El potencial generado se colapsó adicionando 2.5 μM de CCCP.

Medición del gradiente de pH.

Se prepararon liposomas de la manera anteriormente descrita pero cargándolos con 2 mM de 8-hidroxi-1,3,6-pirenotrisulfonato (piranina) (68,76); con estos liposomas se formaron vesículas de la misma manera anteriormente descrita. Las vesículas se pasaron por una columna de 0.7 cm de diámetro y 25 de largo de Sephadex G 25 fino, equilibrado con el mismo amortiguador, para capturar el colorante libre que no fue atrapado en el interior de las vesículas.

Las vesículas (20 μg de proteína de membrana) se adicionaron a una celdilla con 5 mM de MES/TEA, 5 mM de H_3PO_4 pH 7.0 en un volumen final de 2 ml con 2.5 μM de valinomicina y 50 mM de KCl. Se inició la reacción adicionando el sustrato (ascorbato-TMPD-citocromo c). Se midió el cambio de la fluorescencia de la piranina. Las longitudes de onda utilizadas fueron 460-520 nm. En donde se indica, el gradiente de pH se colapsó agregando 2.5 μM de CCCP.

RESULTADOS

Una vez purificada la membrana plasmática, se le midió su actividad de ATPasa para determinar la calidad de la preparación y por lo tanto las condiciones en que se encuentra la enzima después de la purificación. Los valores de actividad se encontraron generalmente alrededor de 1 $\mu\text{mola}/\text{min}/\text{mg}$. Las preparaciones con valores de actividad inferiores se descartaron.

Al estudiar las vesículas, se encontró que si se usaban los liposomas que se formaban con una mezcla de fosfatidilcolina (30 mg/ml) y fosfatidilserina (1 mg/ml), las vesículas eran mas estables que cuando se usaban los liposomas hechos solamente con fosfatidilcolina.

Al medir el consumo de oxígeno de la citocromo oxidasa, en presencia y en ausencia de CCCP, incorporada en las vesículas se encontró que las vesículas de PC/PS tenían un control respiratorio de 1.4 (fig.2A). Las vesículas PE tenían valores similares de control respiratorio (1.37) (fig.2B).

Generación del $\Delta\psi$ y ΔpH

Se determinó la capacidad de la citocromo oxidasa incorporada a las vesículas para generar una fuerza protón-motriz (alcalina y negativa en el interior, con respecto al exterior) tanto en las vesículas PC-PS como en las PE, y ver si se podía utilizar para energizar el

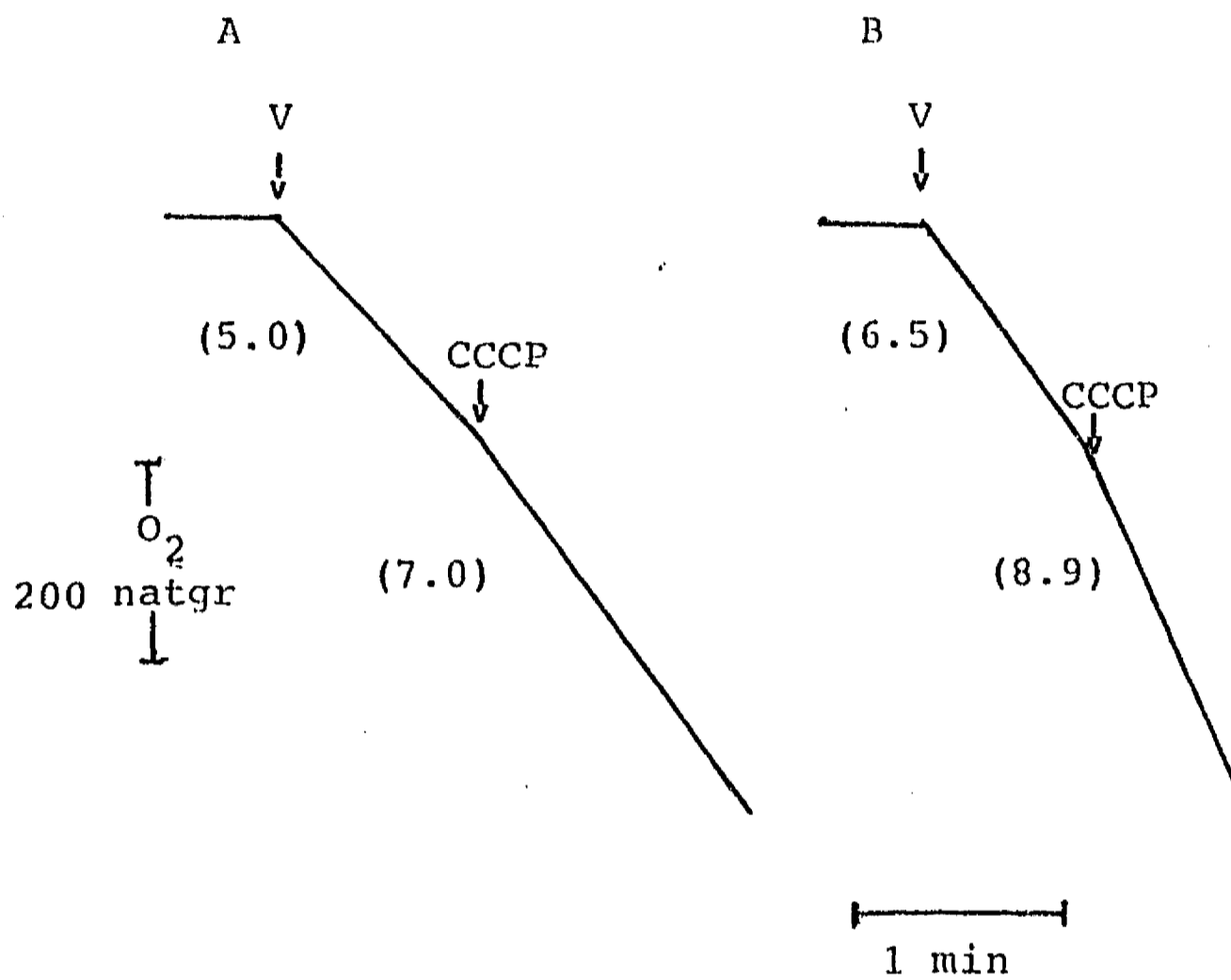


Fig.2.- Oximetría de las vesículas PC-PS y PE.

Las vesículas (60 μM de proteína de membrana) se adicionaron a un medio que contenía 3 ml de 5 mM de Mes, 5 mM de $\text{H}_3\text{PO}_4/\text{TEA}$ pH 7.0, 5 mM de ascorbato, 0.5 mM de TMPD y 150 μM de citocromo c. 6 μM de CCCP se adicionaron donde se indica. Los números entre paréntesis indican los nátomos gr/ μg de citocromo oxidasa.

a) Vesículas PC-PS
c.r = 1.4

b) Vesículas PE
c.r = 1.37

transporte de aminoácidos con este sistema. En otros experimentos se encontró que con este sistema es posible energizar el transporte de Rb^+ (65).

Siguiendo el apagamiento de la cianina fluorescente $\text{DiSC}_3(3)$, también se demostró la formación de un potencial de membrana al adicionar un sistema donador de electrones a las vesículas de membrana plasmática con citocromo oxidasa incorporada. Al adicionar el sustrato a la suspensión de vesículas se formó un potencial de membrana considerable detectado por el apagamiento de la fluorescencia del $\text{DiSC}_3(3)$. Este potencial podía ser anulado al adicionar CCCP posteriormente a la energización (fig.3a). En presencia de valinomicina y KCl no se generó un potencial (fig.3b). El potencial también se colapsó al adicionar valinomicina después de la energización, en vesículas cargadas con 50 mM de KCl (fig. 3c).

También se observó la generación de un gradiente de pH en presencia de valinomicina y K^+ (fig.4b), detectado por el incremento de la fluorescencia de la piranina. Este gradiente se podía colapsar con CCCP. En ausencia de valinomicina y K^+ sólo se pudo obtener un gradiente muy pequeño (fig.4a).

Transporte de leucina

En estas vesículas, se puede medir el transporte de aminoácidos en dos condiciones, utilizando la misma fuente de energía. En una de ellas, sin agregar valinomicina y K^+ , la diferencia de potencial eléctrico de la membrana es el componente predominante del

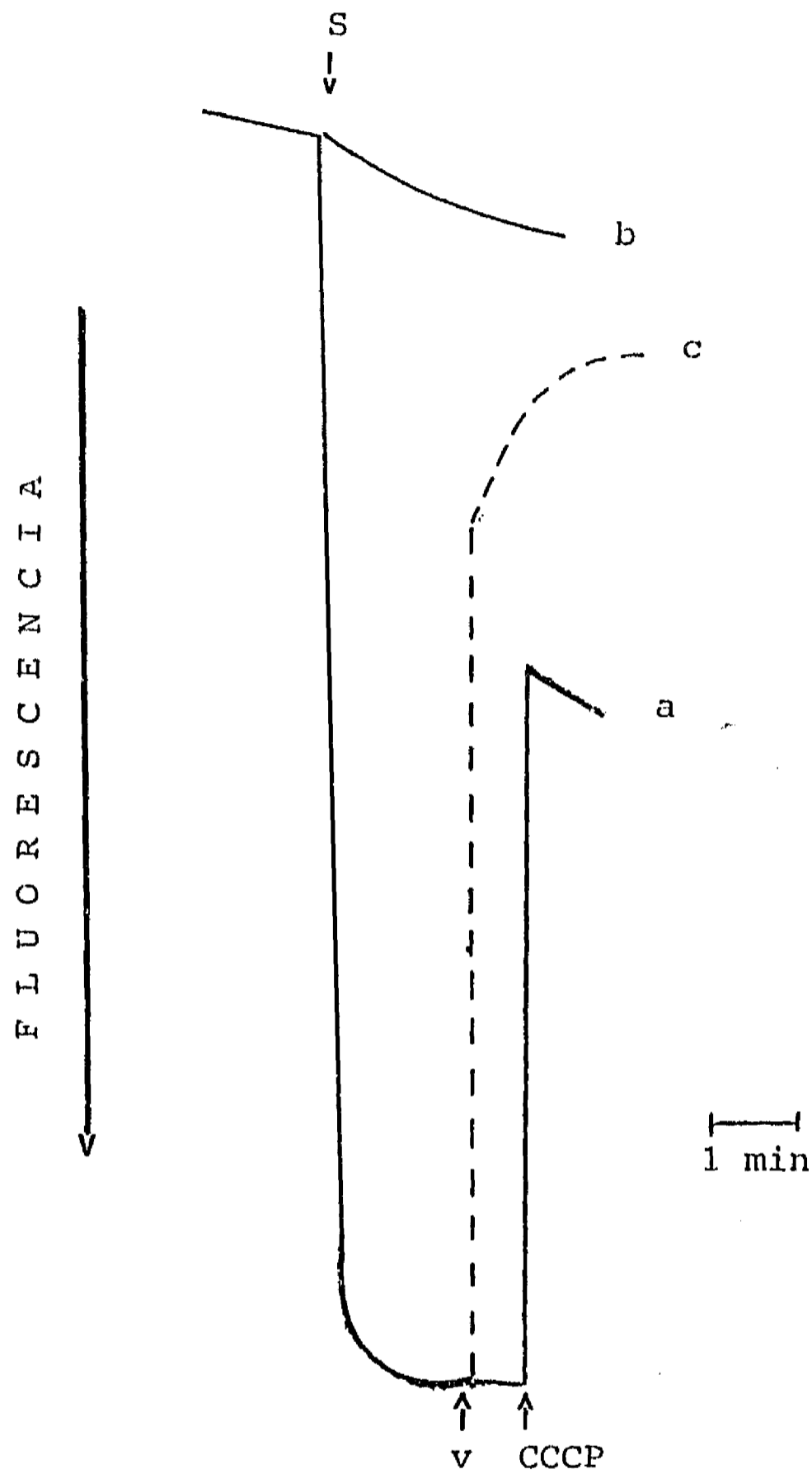


Fig.3.- Detección de un potencial de membrana en vesículas PC-PS

- Las vesículas (50 μg de proteína) se adicionaron a 2 ml de 50mM de Mes, 50 mM de $\text{H}_3\text{PO}_4/\text{TEA}$ pH 7.0 y 2.5 μM de cianina. La reacción se comenzó con la adición del sustrato (S) (1 mM de ascorbato/TEA pH 7.0, 0.1 mM de TMPD y 150 μM de citocromo c), donde se indica se adicionó 2.5 mM de CCCP para colapsar el potencial.
- En presencia de 50 mM de KCl y 2.5 μM de valinomicina, desde el principio.
- Las vesículas se prepararon con 50 mM de KCl y el potencial se colapsó con valinomicina.

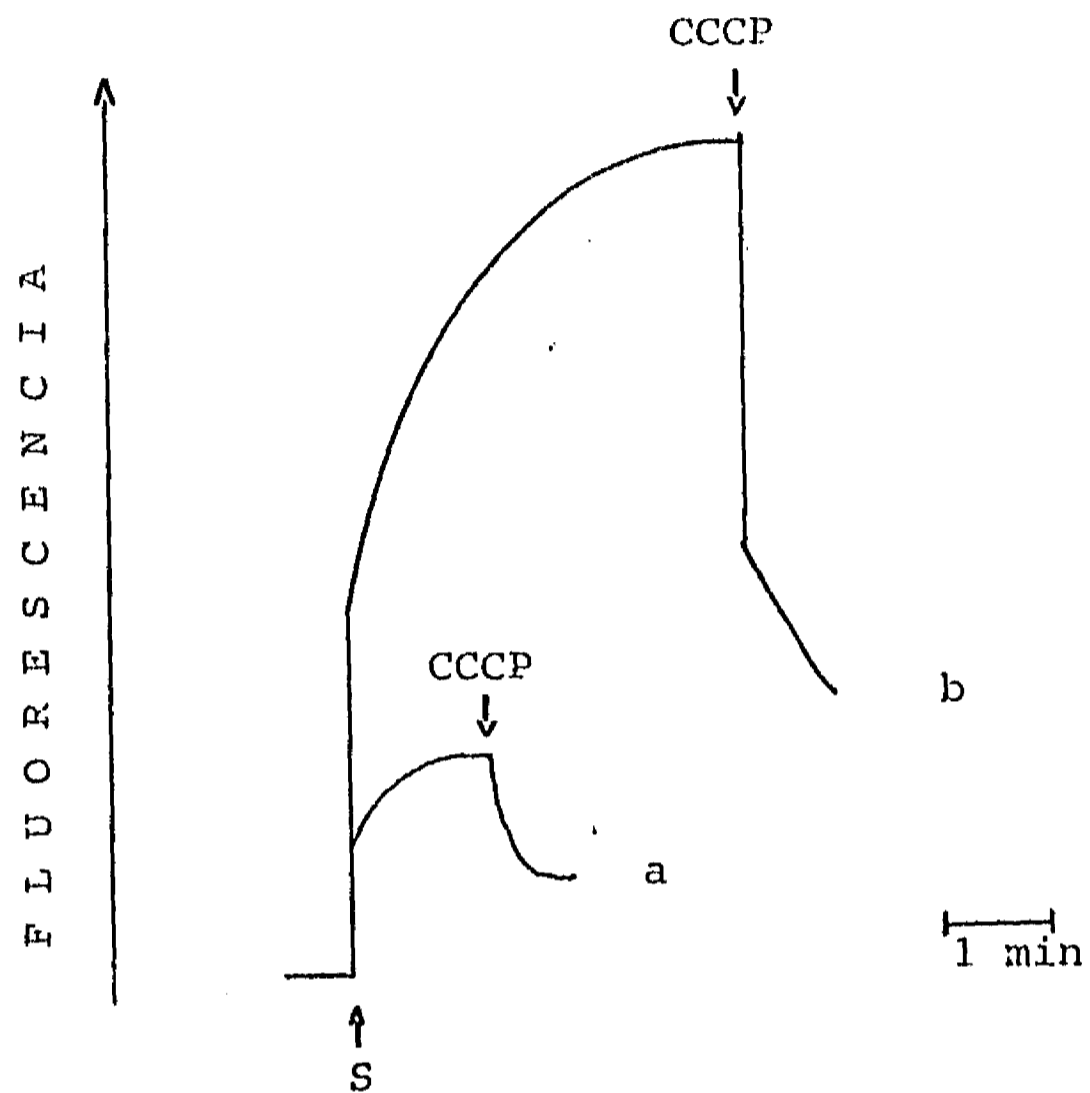


Fig.4.- Detección de un gradiente de pH.

Las vesículas (50 μg de proteína) cargadas con piranina 2 mM se adicionaron a una cuveta con 2 ml de volumen final del mismo amortiguador de la fig.3. La reacción se comenzó adicionando el mismo sustrato indicado en la fig.3

a) En ausencia de valinomicina y KCl.

b) En presencia de valinomicina 2.5 μM y KCL 50 mM. El CCCP 2 μM se adicionó donde se indica.

potencial electroquímico. En la otra, al agregar valinomicina y K^+ , predomina el gradiente de pH.

En las vesículas de PC/PS se estudió el transporte de leucina energizado en presencia o ausencia de valinomicina y K^+ y se observó que en ambas condiciones existe una rápida acumulación de la leucina al adicionar el sistema donador de electrones (fig.5). En estas vesículas se observó un aumento del 10% en la condición donde predomina el potencial de membrana.

En las vesículas de PE la incorporación de leucina fue de 12 nmolas/mg de proteína en presencia de valinomicina y K^+ mientras que en su ausencia fue de 4 nmolas/mg de proteína (fig.6). La incorporación de leucina en estas vesículas es mayor que en las vesículas de PC-PS, en donde solo se observó una entrada de 1 nmola/mg de proteína. En ambas si se agrega CCCP desde el principio, no hay transporte del aminoácido, su adición a las vesículas que ya habían acumulado leucina, causa eflujo del aminoácido.

Efecto del pH

Dado que la propuesta general es que el transporte de los aminoácidos esta impulsado por la diferencia de concentración de protones entre el exterior y el interior de la levadura (ΔpH), se estudió el efecto del pH sobre el transporte de aminoácidos en las vesículas PC-PS. La idea era que al aumentar el número de protones en el exterior, aumentaría el transporte, ya que con esto, aumentaría la contribución del gradiente de protones. Para esto se utilizó

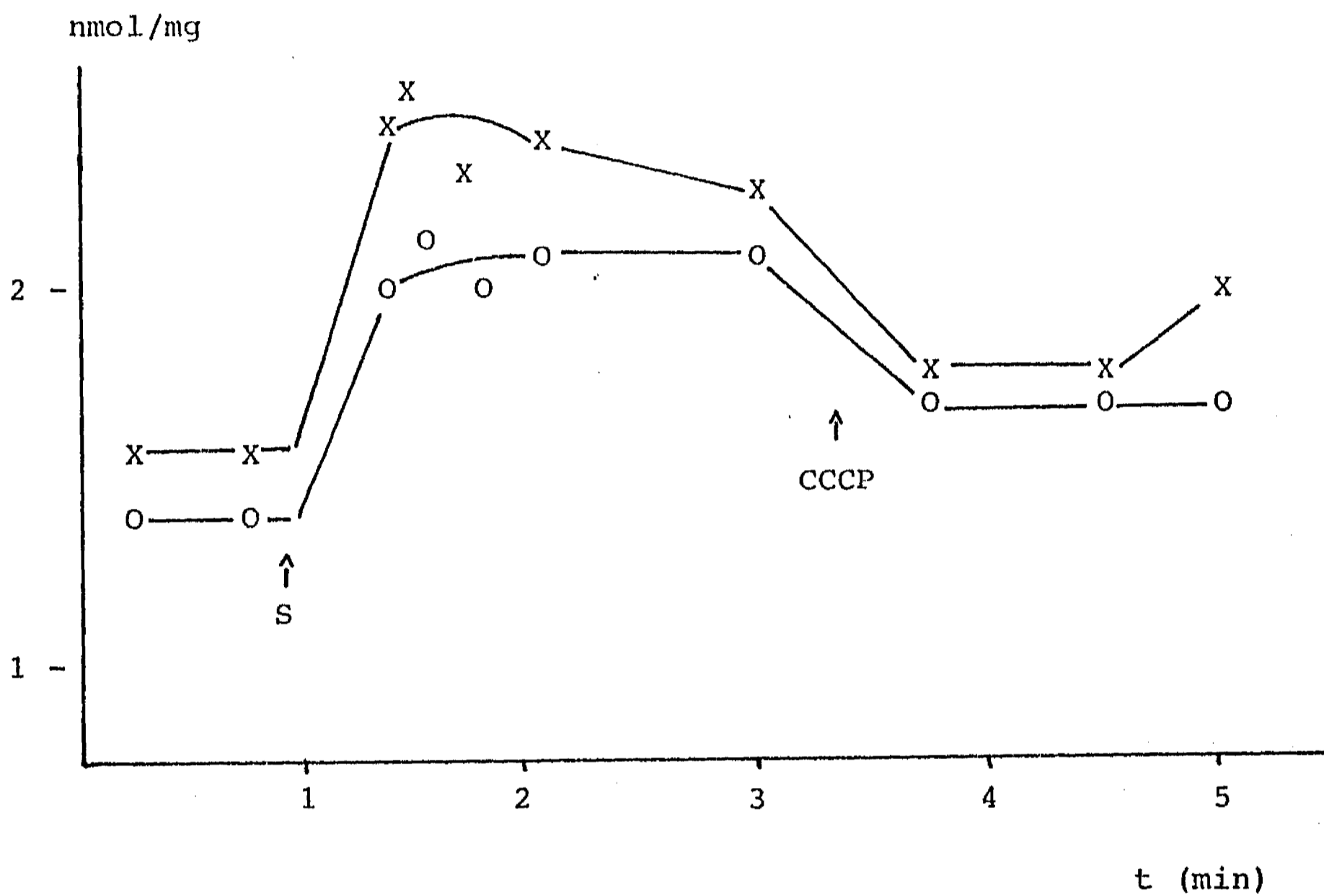


Fig.5.- Transporte de leucina en las vesículas PC-PS.

Las vesículas se adicionaron a 50 mM de H_3PO_4 /TEA pH 7.0, 5mM de $MgSO_4$, 50 μM de leucina $^3[H]$. En presencia (X) o en ausencia (O) de 50 mM de KCl y 2.5 μM de valinomicina. El sustrato (50 mM ascorbato/TEA pH 7.0, 0.5 mM de TMPD y 290 μM de citocromo c) se adicionó donde se indica al igual que 6 μM de CCCP.

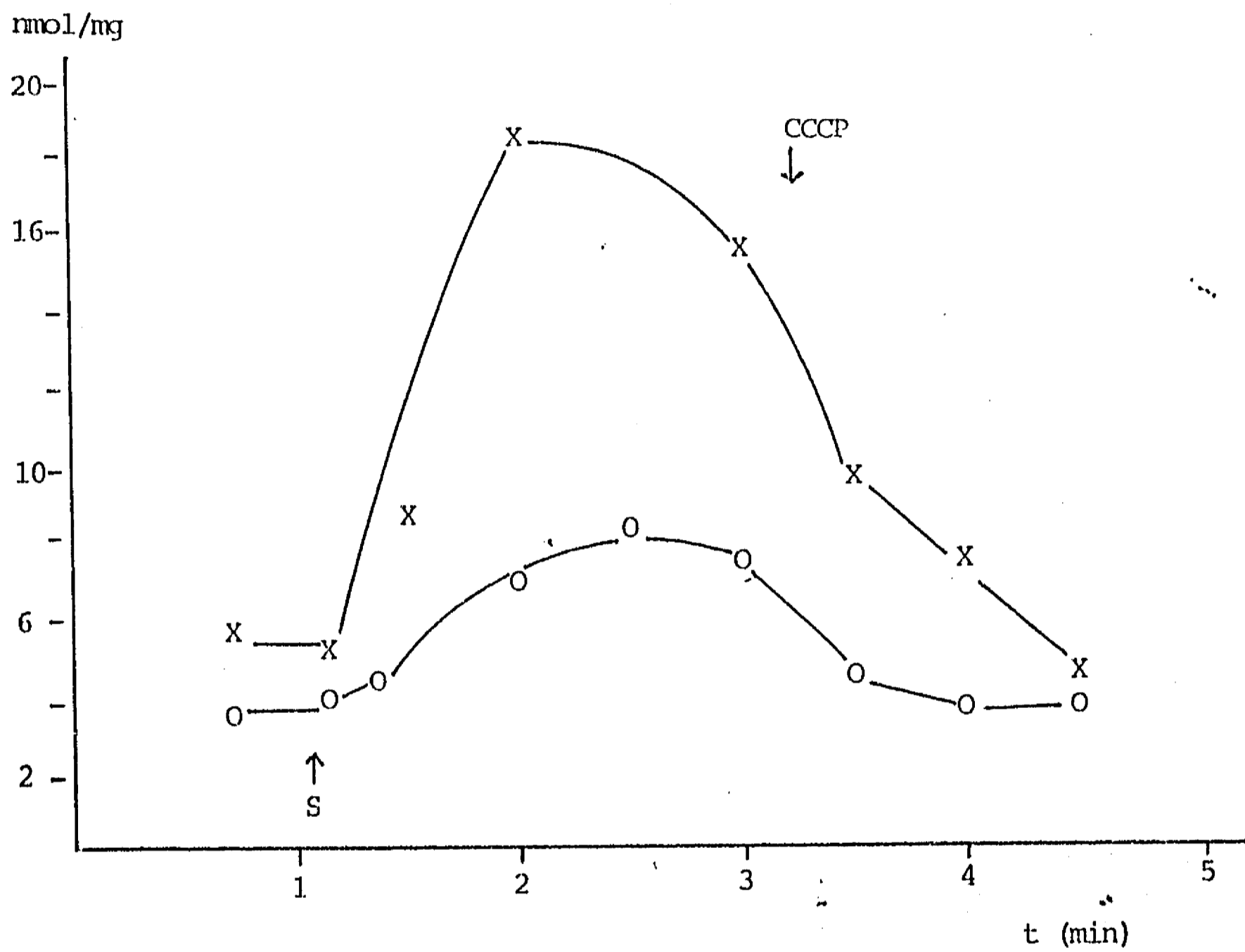


Fig.6.- Transporte de leucina en las vesículas PE.
 Las condiciones son las mismas que la figura anterior.
 (O) Control (X) 10 μM de valinomicina, 50 mM de KCl.

el mismo amortiguador para todos los pHs probados, consistente en una mezcla de 5mM de MES, 5 mM de H_3PO_4/TEA a pH 6.0, 7.0 y 8.0. Se determinó el potencial de membrana y el gradiente de pH en las vesículas a esos pHs externos.

Se prepararon vesículas con un pH interno de 6 y se colocaron en los diferentes pHs externos. Primero se estudió el efecto del pH sobre la generación del potencial eléctrico y del gradiente de pH. Se encontró que el potencial de membrana (fig.7A) es semejante a los tres valores de pH; sin embargo, el gradiente de pH (fig.7B) mostró cambios, siendo mucho mayor a un pH externo de 6.0, que a pH 7.0. A pH 8.0 no se generó un gradiente.

Cuando el pH interno de las vesículas era de 7.0, los resultados fueron similares a los anteriores (fig.8A), aunque el gradiente de pH fue un poco menor que en las vesículas preparadas con pH interno de 6.0 (fig.8B).

Se descartó un efecto directo del pH sobre los compuestos fluorescentes, ya que en ambos casos, con la cianina (fig.9) y con la piranina (68,76), la fluorescencia fue menor a pH 6.0 que a pH 7.0 y 8.0.

Las variaciones del pH no tuvieron efecto significativo sobre la actividad de la citocromo oxidasa, ya que aunque su actividad óptima en las vesículas con pH interno de 7.0 se encontró con pH externo de 6.0 y disminuyó cuando el pH externo se modificó a 7.0 y 8.0, la tasa de acoplamiento, o sea, el control respiratorio, dió valores de 1.3 a pH 6.0 externo y 1.1 a pH 8.0 externo.

El transporte de leucina se midió en las vesículas PC-PS con pH interno de 7.0 y a los diferentes pHs externos, encontrándose que a todos los pHs existe un transporte semejante (fig.10).

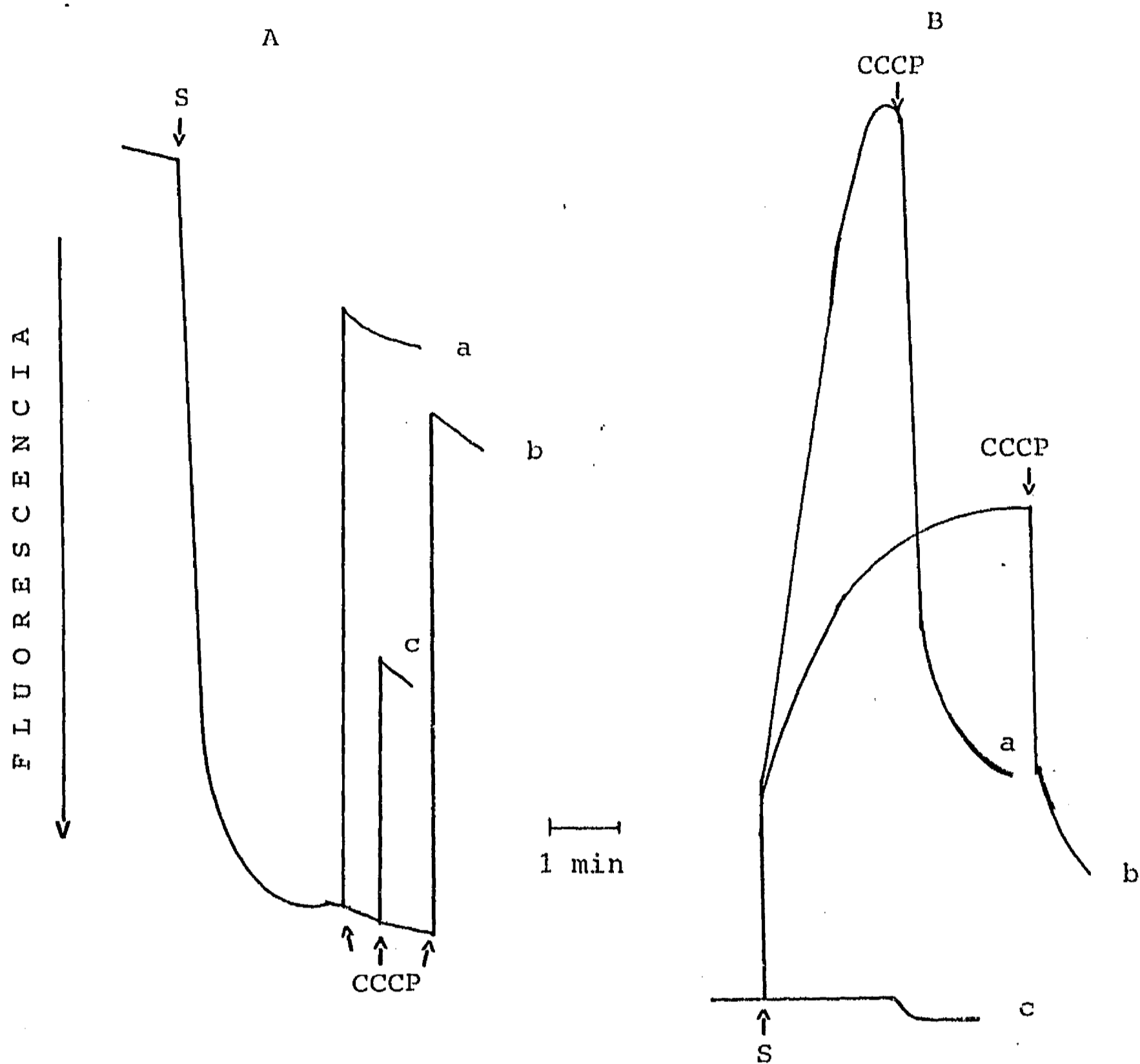


Fig.7.- Efecto del pH sobre la generación de un $\Delta\Psi$ (A) y un ΔpH (B).

Las vesículas se prepararon a un pH interno de 6.0 en 5 mM de Mes/ H_2PO_4 /TEA y se adicionaron a una celda con un volumen final de 2 ml del mismo amortiguador, en las mismas condiciones utilizadas en la fig. 3 para el $\Delta\Psi$ y en la fig.4 para el ΔpH , a: (a) pH 6.0, (b) pH 7.0, y (c) pH 8.0. La reacción se inició con la adición de sustrato y se colapsó con la adición de 2.5 μM de CCCP.

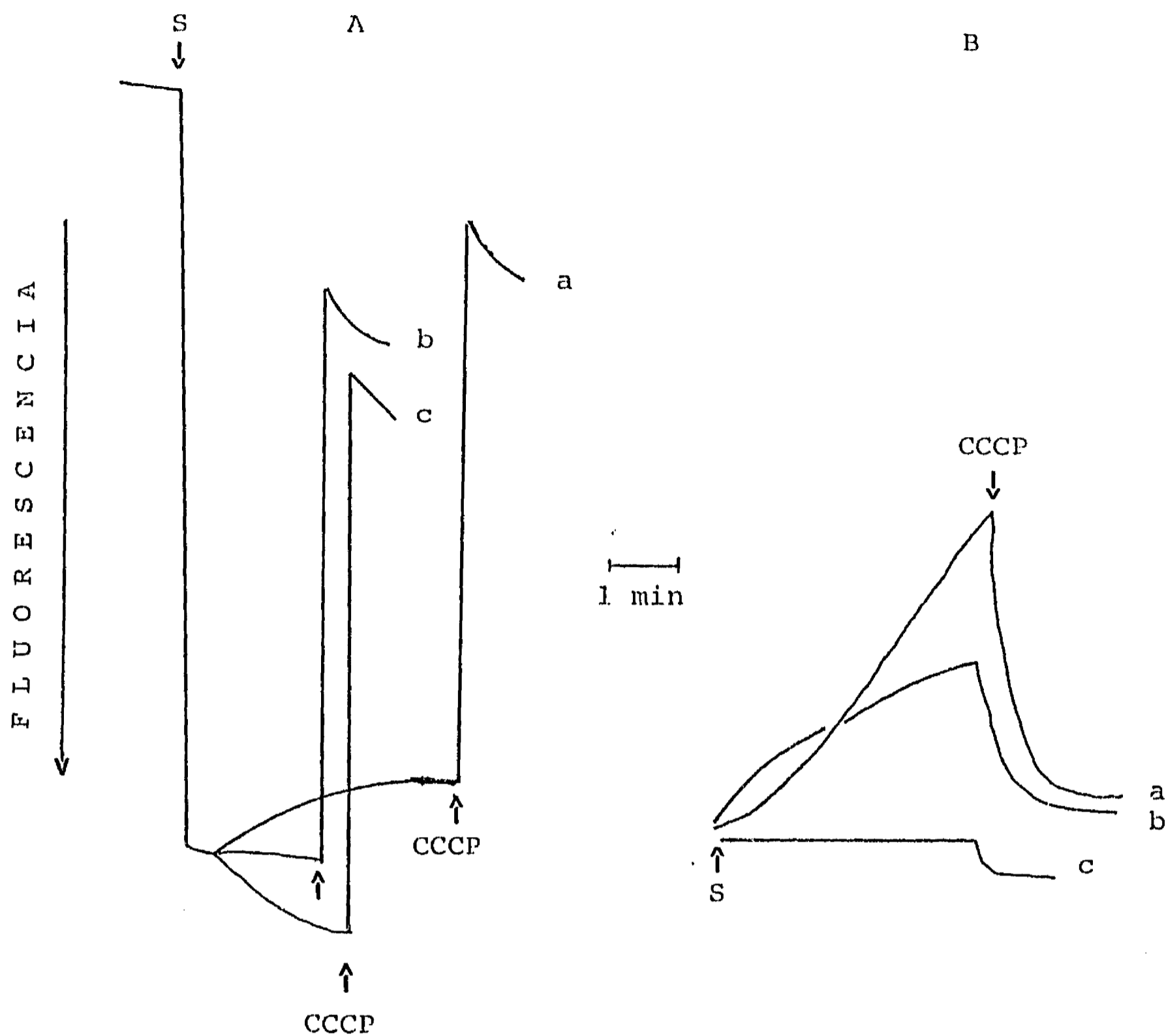


Fig.8.- Efecto del pH sobre la generación de un $\Delta\Psi$ (A) y un ΔpH (B).

Las vesículas se prepararon a un pH interno de 7.0 con el mismo amortiguador y se adicionaron a las celdas en las mismas condiciones que en la figura 3, en el mismo amortiguador a : (a) pH 6.0, (b) pH 7.0 y (c) pH 8.0. Se utilizaron las mismas condiciones de sustrato y CCCP.

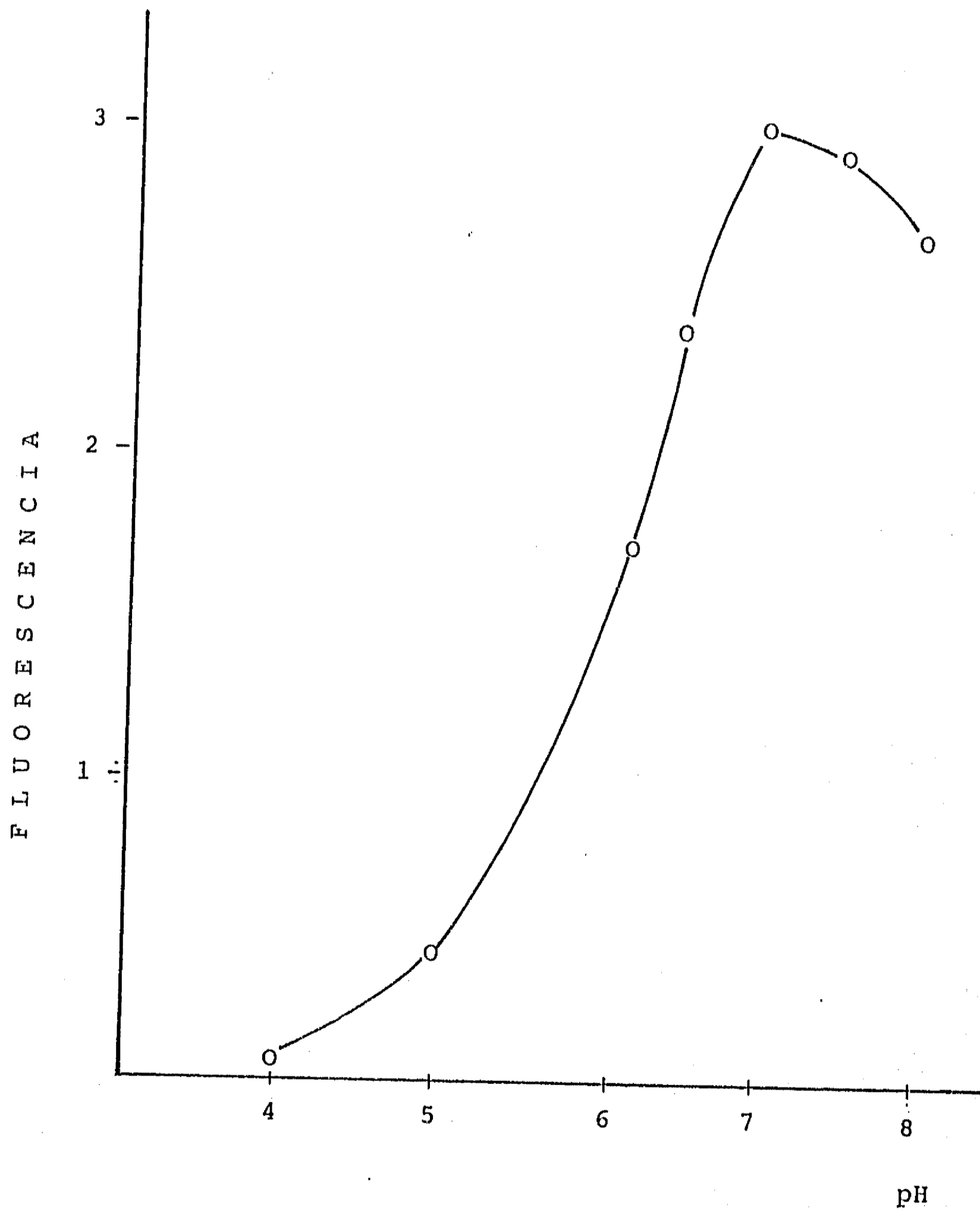


Fig.9.- Efecto del pH sobre la fluorescencia de la cianina DiSC₃(3).

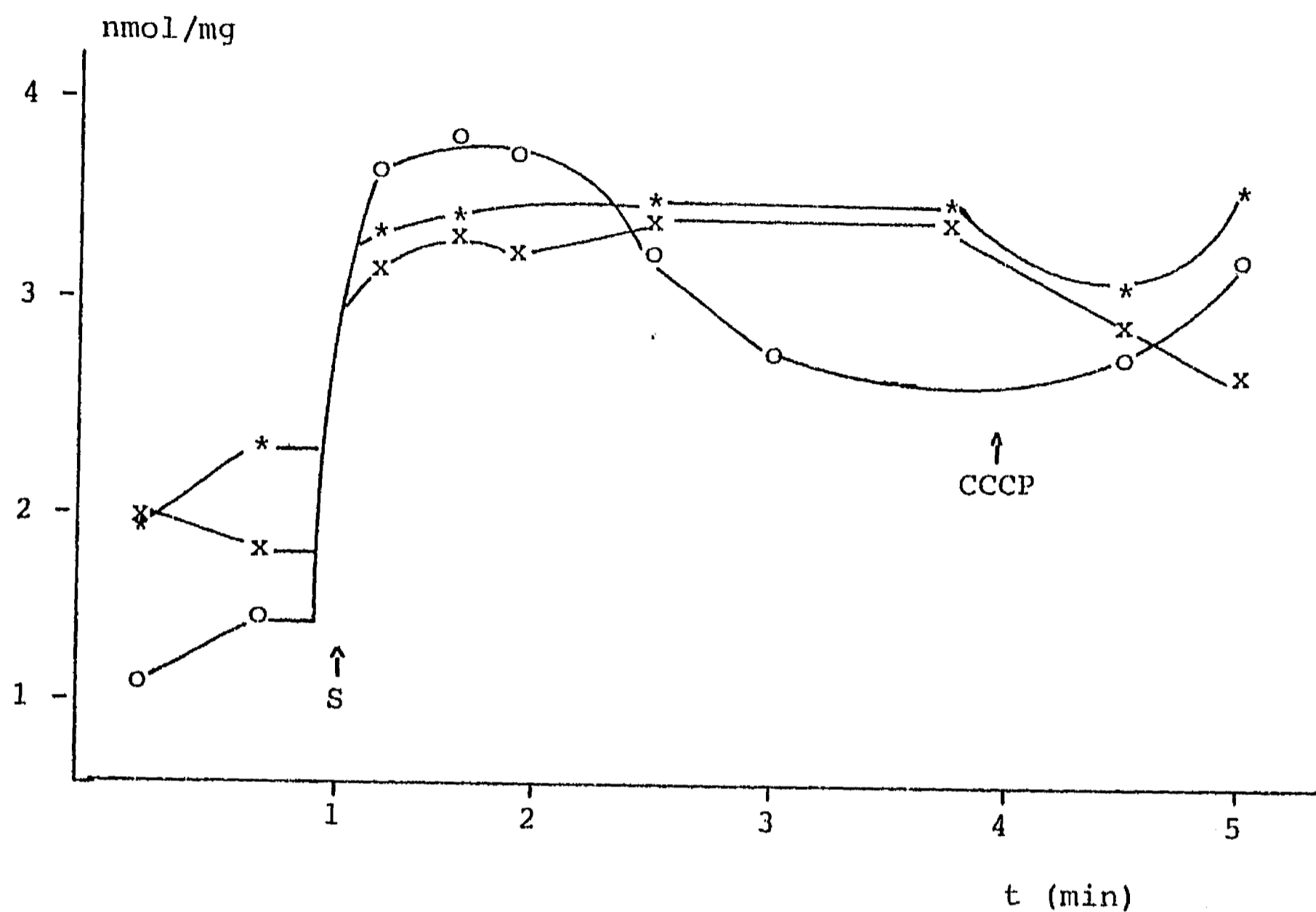


Fig.10.- Efecto del pH sobre el transporte de leucina en las vesículas PC-PS.

Las vesículas se prepararon a un pH 7 interno en el mismo amortiguador y se midió el transporte de leucina en las mismas condiciones que en la figura 5, a pH externo de : (O) pH 6.0, (X) pH 7.0 y (*) pH 8.0 en el mismo amortiguador.

Transporte de ácido aspártico

Como ejemplo de un aminoácido cargado negativamente se estudió el transporte del ácido aspártico. Este transporte se observó al ser energizado por la adición del sustrato donador de electrones, en las vesículas de PC-PS con la citocromo oxidasa incorporada, a un pH interno y externo de 7.0 (fig.11). La incorporación fue de 0.4 nmolas/mg de proteína.

El efecto de la valinomicina sobre el transporte del ácido aspártico fue muy inconsistente en ambos tipos de vesículas. Por lo que decidimos utilizar el ácido glutámico.

Transporte de ácido glutámico

El transporte de ácido glutámico se realizó en las vesículas de PE (fig.12). Se observa una incorporación de 6.9 nmoles/mg de proteína. Al realizar el transporte en presencia de valinomicina y potasio, o sea en ausencia de un potencial de membrana, se observó una disminución en la incorporación del aminoácido, siendo de 5.9 nmoles/mg de proteína. Esto representa una disminución del 14.5%. Las gráficas no parten del mismo nivel y es algo que se obtiene consistentemente, si se normalizan la disminución es de un 7.3%.

Transporte de arginina

En las vesículas PC-PS se pudo observar una incorporación de arginina de 0.8

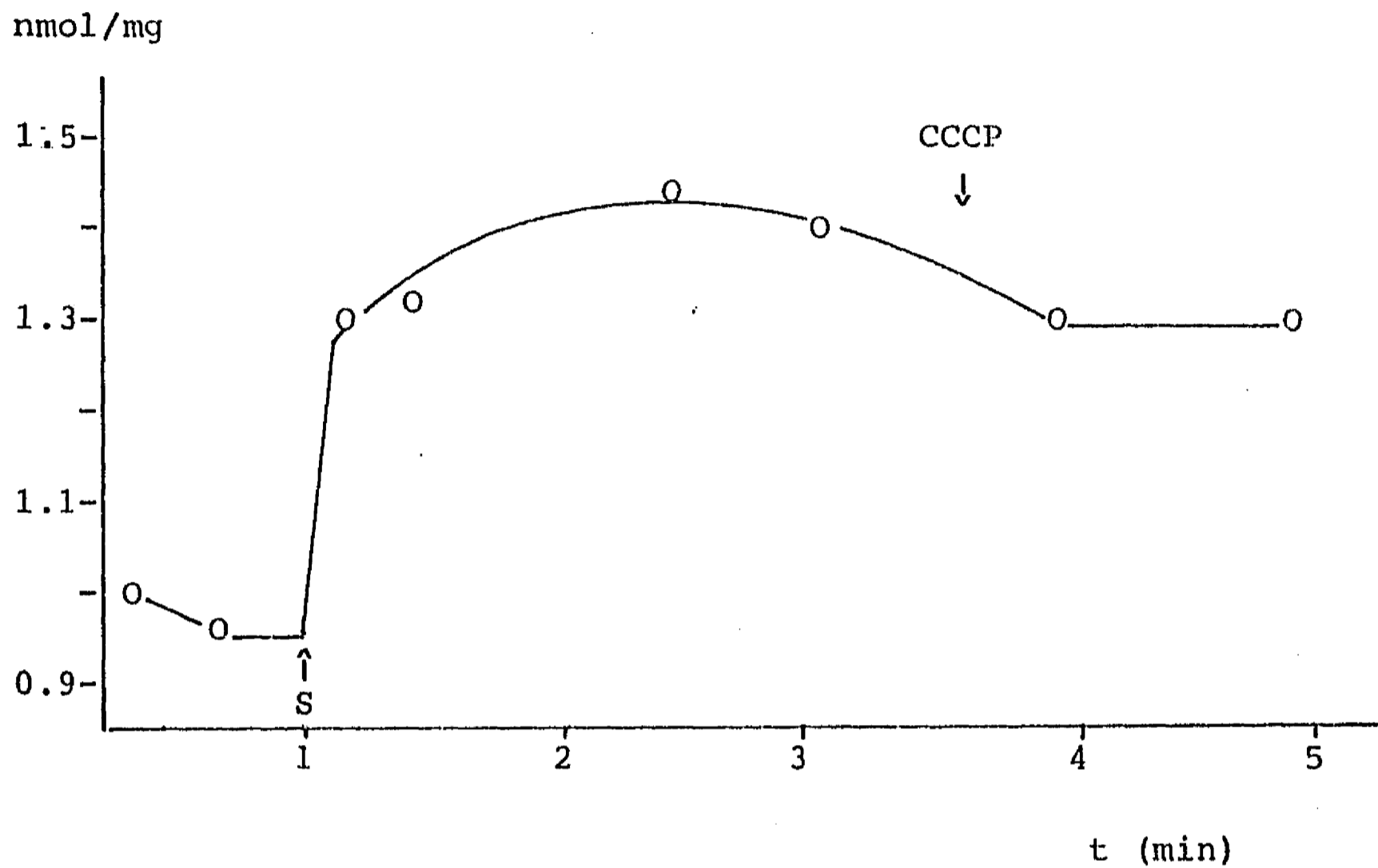


Fig.11.- Transporte de ácido aspártico en vesículas PC-PS.
 Las vesículas se adicionaron en 50 mM de H_2PO_4/TEA pH 7.0, 5mM de $MgSO_4$, 50 μM de ácido aspártico $^3[H]$. El sustrato (50 mM ascorbato /TEA pH 7.0, 0.5 mM de TMPD y 290 μM de citocromo c), se adicionó donde se indica al igual que 6 μM de CCCP.

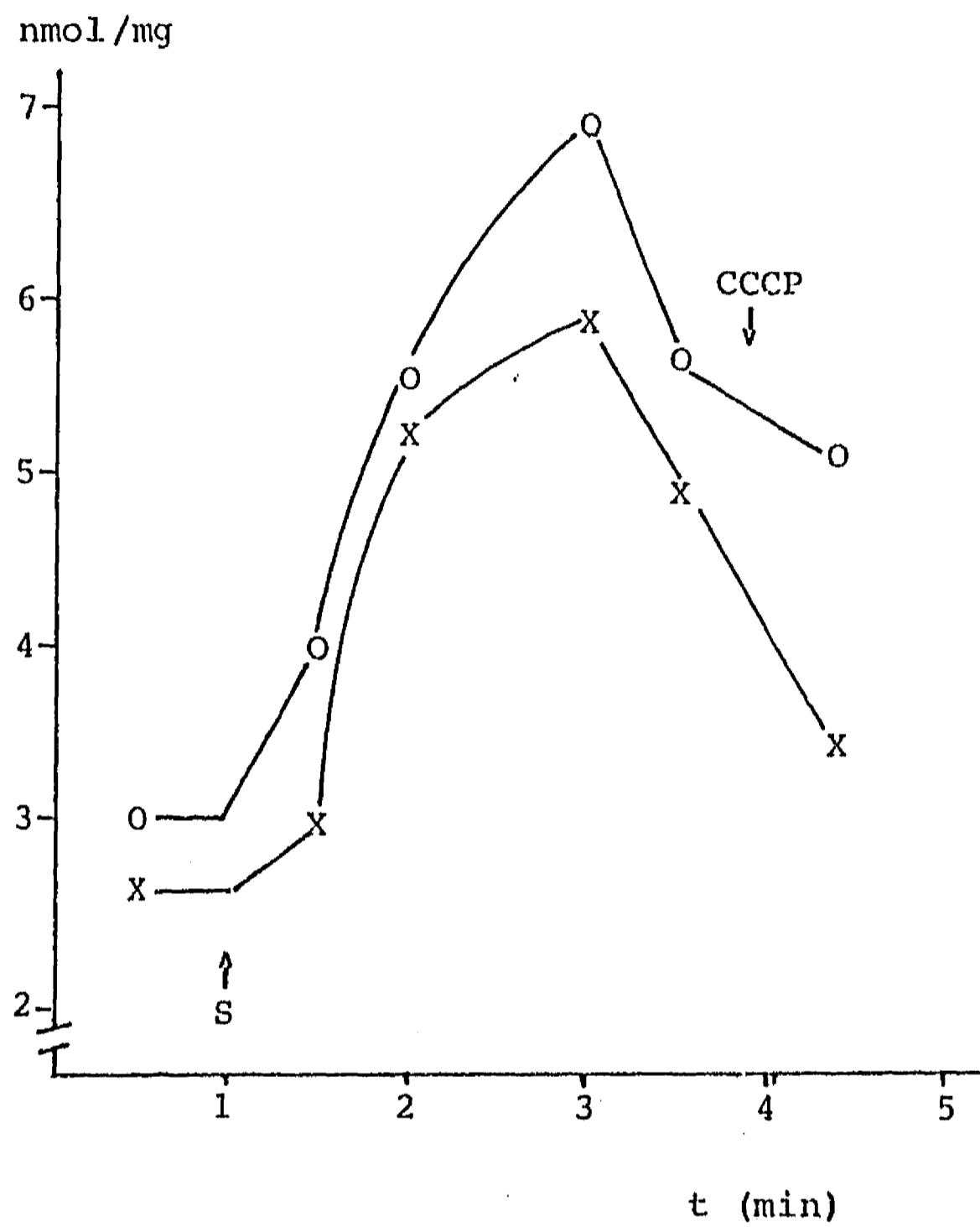


Fig.12.- Transporte de ácido glutámico en vesículas PE.
(O) Control (X) con 10 μ M de valinomicina y 50 mM de KCl

nmolas/mg de proteína; la cual no se obtuvo en presencia de valinomicina y potasio (fig.13). En las vesículas de PE (fig.14) se obtuvo una captación de 0.2 nmolas/mg de proteína en ausencia de un potencial de membrana.

Especificidad del transporte

Para estudiar la especificidad del transporte y explorar la posibilidad de que se estuviera midiendo más de un sistema de transporte, se hicieron experimentos de competencia. Se utilizaron leucina, aspártico y arginina. Se encontró que el transporte de aspártico (50 μM) en presencia de leucina (50 μM) produce una inhibición (Fig.15).

En cambio, el transporte de arginina (10 μM) (fig.16) en presencia de 50 μM de leucina, no parece competir por el transporte. Tampoco se observó inhibición aumentando la concentración de arginina hasta 25 μM .

Efecto de la arginina sobre el $\Delta\Psi$ y ΔpH .

Dado los resultados que se obtuvieron en el transporte se quiso ver si se detectaba algún cambio en el $\Delta\Psi$ o en el ΔpH ocasionado por la entrada del aminoácido. Se observó que la arginina desde 10 μM hasta 250 μM , disminuye el potencial de membrana, detectado con la cianina, en un 30% aproximadamente, mientras que el gradiente de pH no varía a estas

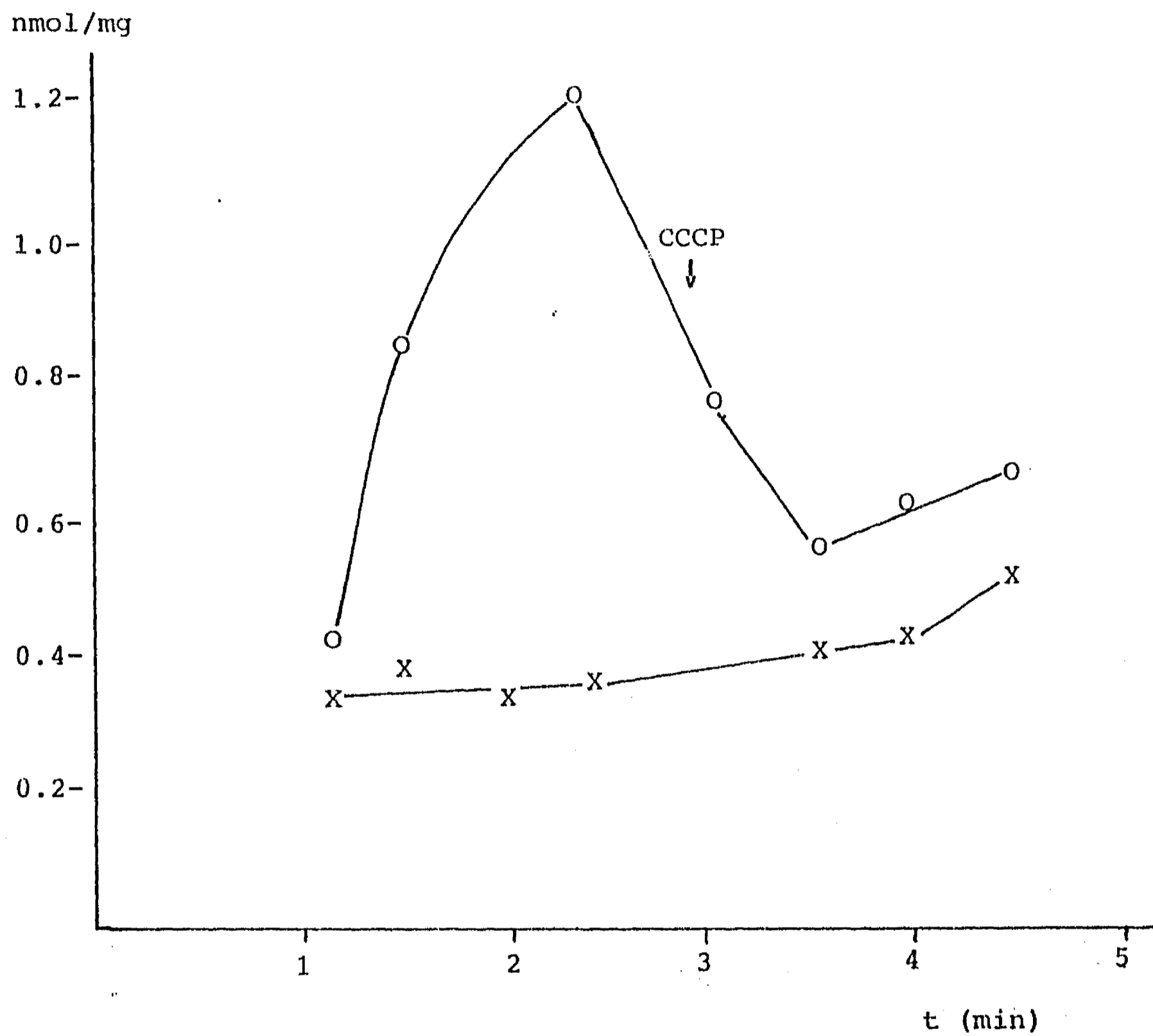


Fig.13.- Transporte de arginina en vesículas PC-PS.
(O) Control (X) con 10 μM de valinomicina y 50 mM de KCl

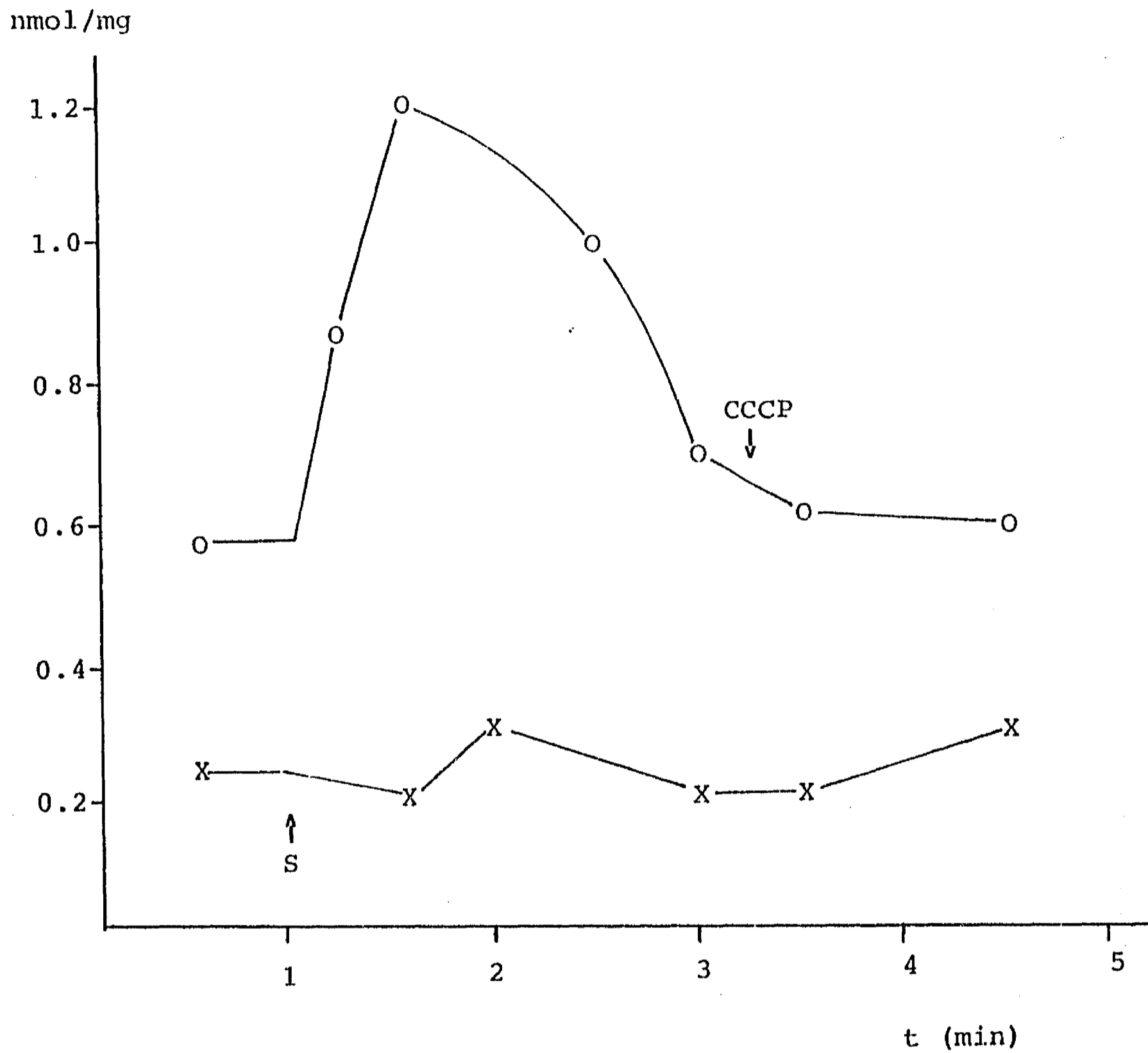


Fig.14.- Transporte de arginina en vesículas PE.
 El transporte se realizó según se indica en la metodología
 (O) Control (X) con 10 μ M de valinomicina y 50 mM de KCl

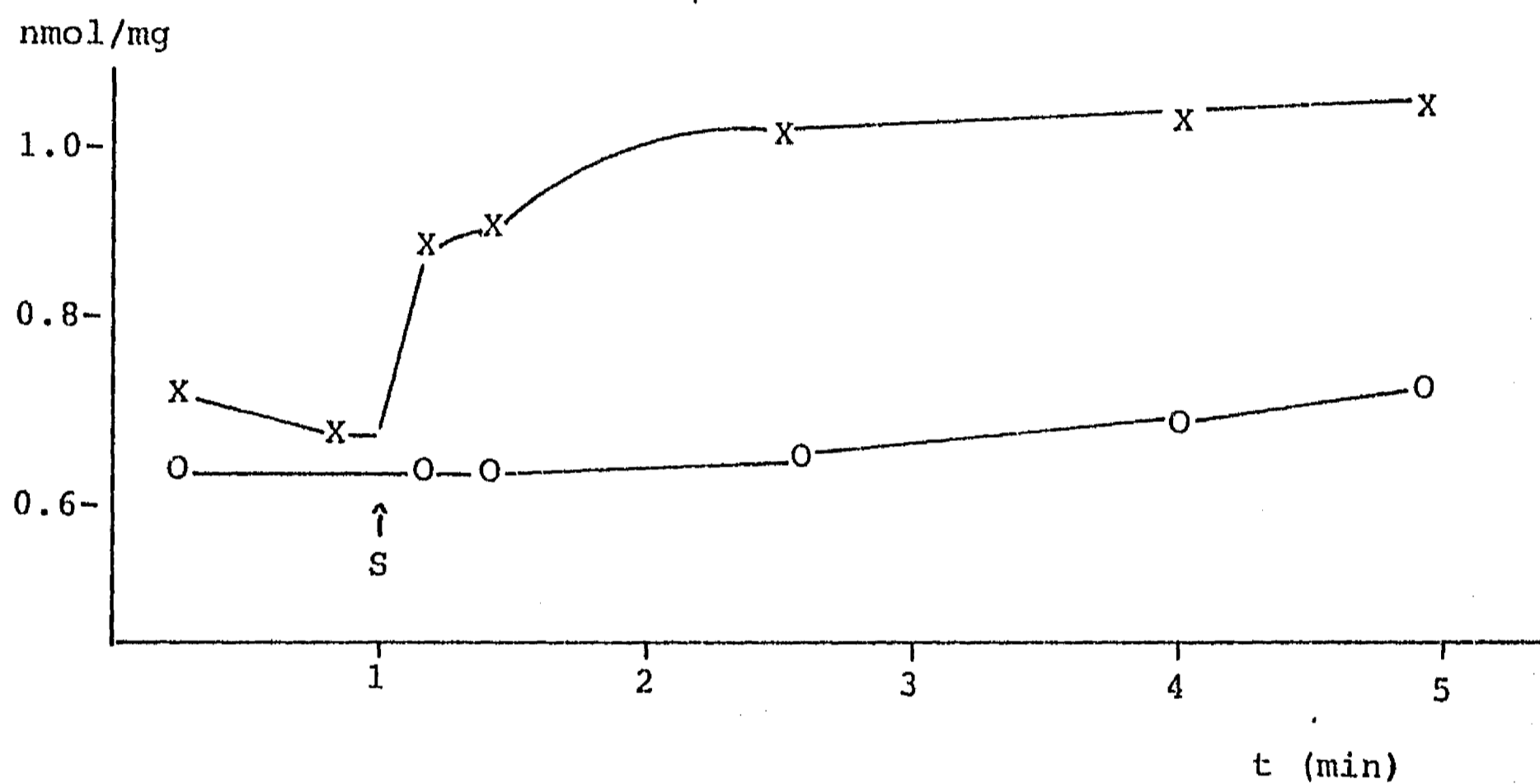


Fig.15.- Efecto de la leucina sobre el transporte de aspártico.
 El transporte se realizó según se indica en la metodología.
 (X) Control (O) con 50 μ M de leucina

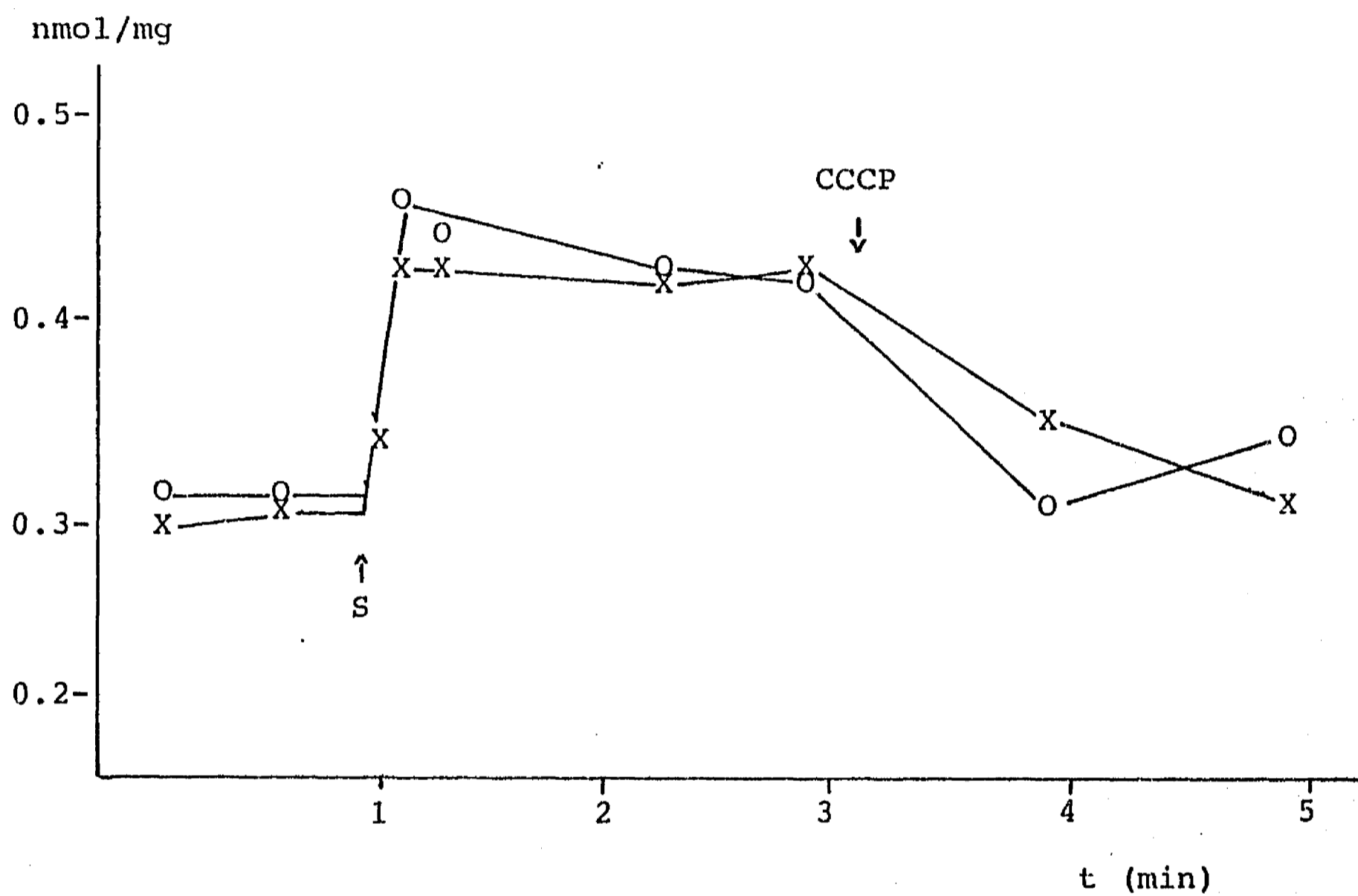


Fig.16.- Efecto de la leucina sobre el transporte de arginina.
 El transporte se realizó según se indica en la metodología.
 (O) Control (X) con 50 μ M de leucina

concentraciones (fig.17).

Efecto del ácido glutámico sobre el $\Delta\Psi$ y ΔpH .

Si se adiciona el ácido glutámico a las vesículas no se observa un cambio en el potencial de membrana medido por fluorescencia, sin embargo, a concentraciones entre 60 μM y 100 μM el gradiente de pH disminuyó en un 50%. A concentraciones menores no se modificó y a concentraciones mayores (hasta 500 μM) se recuperó (fig.18).

Efecto de los aminoácidos sobre la actividad de la citocromo oxidasa.

Se midió el consumo de oxígeno de la citocromo oxidasa incorporada en las vesículas de PE, en presencia de arginina y ácido glutámico, debido a que con estos aminoácidos se detectaron cambios en el $\Delta\Psi$ y ΔpH respectivamente.

Con la arginina no se observan cambios en la actividad de la citocromo oxidasa. En cambio con el ácido glutámico se observa que la actividad de la citocromo oxidasa se incrementa a partir de 100 μM de ácido glutámico adicionado (tabla 1). Esto coincide con las concentraciones en las cuales se observa una recuperación del ΔpH medido con piranina (fig.17). El incremento máximo observado en la actividad fue de un 28 %.

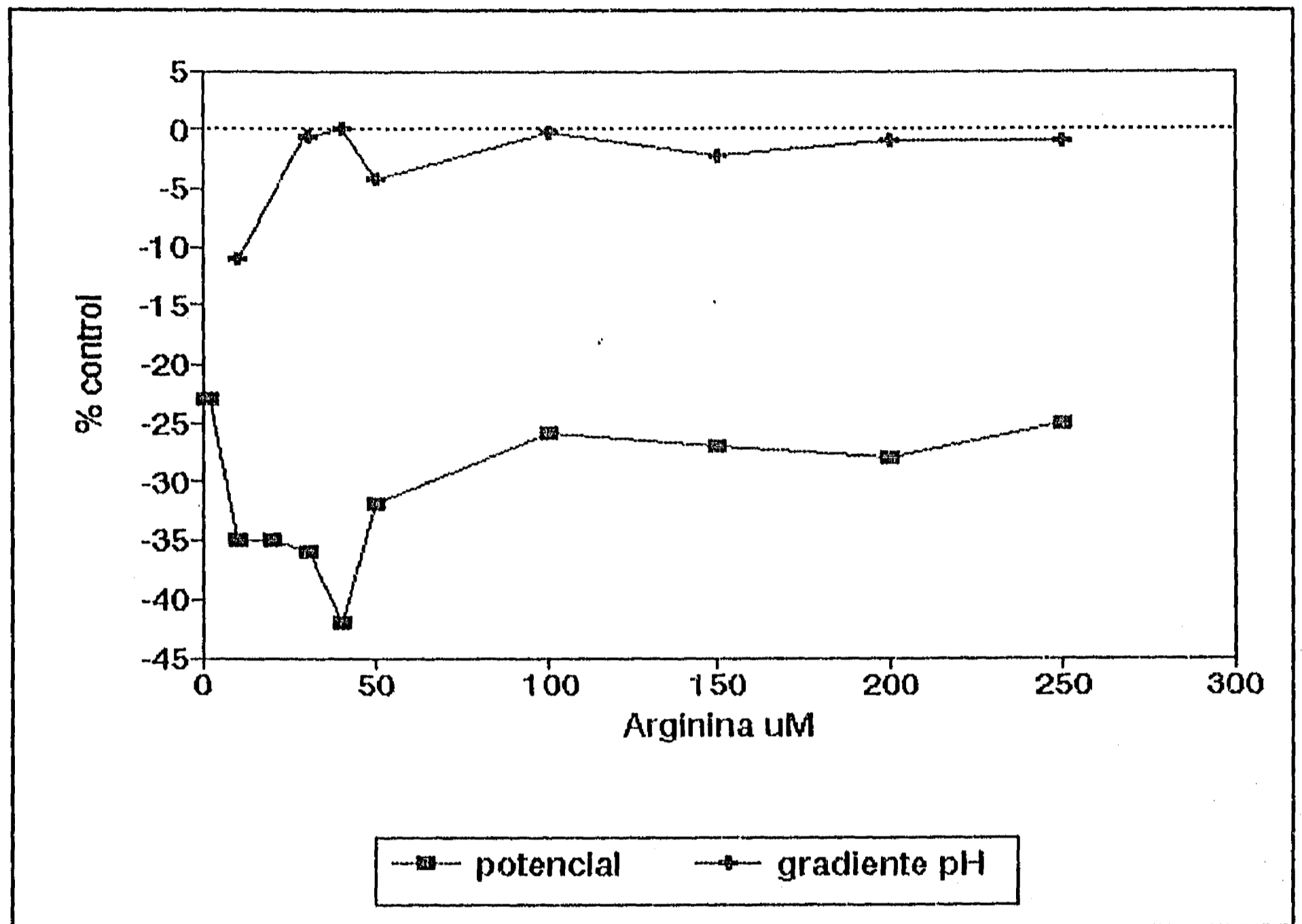


Fig.17.- Efecto de la arginina sobre el $\Delta\Psi$ y ΔpH

Se utilizaron las mismas condiciones para la medición del $\Delta\Psi$ y ΔpH adicionando diferentes concentraciones de arginina.

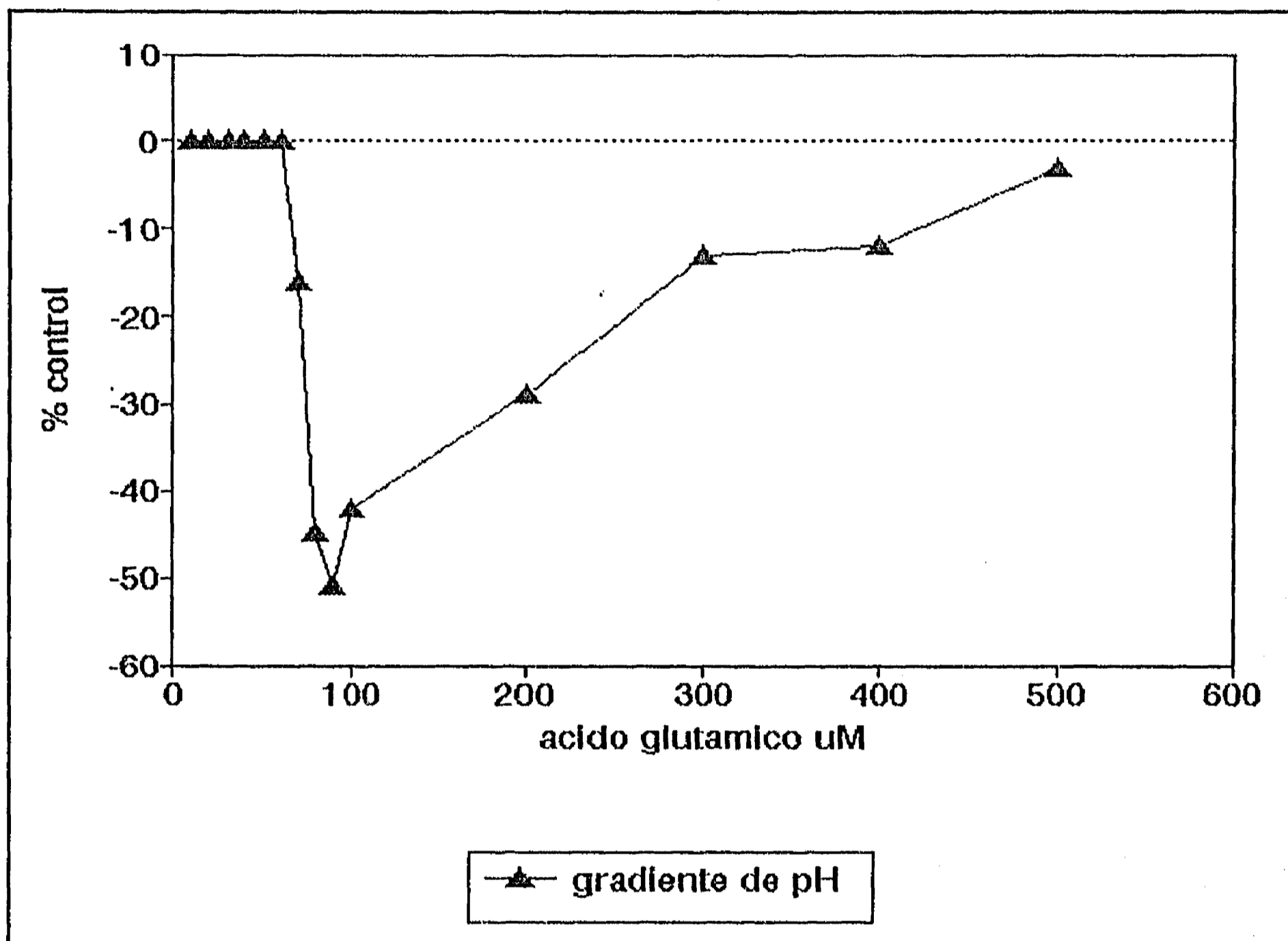


Fig.18.- Efecto del ácido glutámico sobre el Δ pH.

Se utilizaron las mismas condiciones de medición del $\Delta\Psi$ y Δ pH adicionando diferentes concentraciones de ácido glutámico.

Concentración del amino- ácido (μM)	ácido glutámico $\text{natmgO}_2/\text{min}/\mu\text{g}$	arginina $\text{natmgO}_2/\text{min}/\mu\text{g}$
0	5.65	5.48
10	5.50	5.48
50	5.35	5.31
100	6.34	5.48
200	6.40	5.48
300	7.20	5.48
400	7.20	5.48

Tabla 1.- Efecto del ácido glutámico y la arginina sobre la actividad de la citocromo oxidasa.

Se midió el consumo de oxígeno de la citocromo oxidasa en vesículas de PE como se indica en la metodología, adicionando las diferentes concentraciones del aminoácido al medio de reacción.

DISCUSION

En los microorganismos eucariontes, la entrada de aminoácidos está catalizada por una gran cantidad de acarreadores diferentes con diversos grados de especificidad. Esta heterogeneidad está determinada no sólo por la variedad de proteínas implicadas en el transporte mismo, sino también por una regulación en la síntesis y actividad de cada una en respuesta a cambios del medio ambiente y a las necesidades metabólicas.

No obstante que, principalmente a partir de los trabajos de Eddy (47), se ha intentado asignar un mecanismo general al transporte de los aminoácidos, parecería probable que haya, no sólo diversidad en los acarreadores, sino también distintos mecanismos para el transporte y para los enlaces con los elementos de aporte energético de la célula, como la diferencia de potencial transmembranal y el gradiente de pH. De hecho, muchos de los estudios realizados han involucrado a un solo aminoácido, y a partir de esto se han establecido generalizaciones (Ballarin Denti et al. (22)). El sistema que se utilizó debe considerarse como una primera aproximación para definir diferencias en el mecanismo del transporte de diferentes tipos de aminoácidos.

Este trabajo pretendió aprovechar la ventaja que ofrecen las vesículas de membrana plasmática de levadura para hacer estudios de transporte (65,91). Hubo, desde luego, algunas particularidades del sistema a estudiar que tuvieron que ser

tomadas en cuenta. Por ejemplo, se sabe que la presencia de amonio en el medio inhibe a la permeasa general y a los acarreadores específicos. Sin embargo, al cultivar las células en un medio con prolina como fuente de nitrógeno, se ha visto un aumento en la entrada de muchos aminoácidos (6); es por ello que en este trabajo las células fueron cultivadas en un medio con prolina, en ausencia de amonio, en un intento de asegurar la expresión de todos los acarreadores.

La purificación de las membranas se llevó a cabo con las modificaciones ya descritas (77) a la técnica de Franzusoff y Cirillo (60). Con esta técnica no existe contaminación importante por ningún otro tipo de membrana, y la plasmática se obtiene en muy buenas condiciones. Esto fue evaluado midiendo la actividad de la ATPasa de protones de la membrana plasmática y la sensibilidad a diferentes tipos de inhibidores; el procedimiento mostró alguna contaminación pequeña por membrana mitocondrial.

En la preparación de los liposomas se utilizaron distintas mezclas de fosfolípidos, empezando con fosfatidilcolina (PC) y fosfatidilserina (PS), ya que existe una dependencia entre la actividad de los acarreadores y el medio ambiente lipídico que los rodea (71); también se utilizaron los lípidos de *E.coli* de Sigma Co. La membrana de *E.Coli* se encuentra constituida principalmente por fosfatidiletanolamina (PE), fosfatidilglicerol (PG), y cardiolipina (CL) en una proporción de 75/15/15 % por peso respectivamente. Diferentes autores han obtenido mejores resultados con estos lípidos que con asolectina (75,78,79).

El papel que juegan las cabezas polares de los fosfolípidos ha sido estudiado

para el acarreador de lactosa en *E.coli* (78), el acarreador de leucina dependiente de Na^+ de *Pseudomonas aeruginosa* (79), el acarreador de leucina de *Streptococcus cremoris* (71), en vesículas de membrana plasmática de *Kluyveromyces marxianus*, en donde el transporte de D-galactosa aumenta al incorporar a las vesículas los lípidos extraídos de *E.coli* (75) y para otros tipos de transportadores, en su mayoría de bacterias. Se ha observado que al aumentar la cantidad de PE o PS aumenta la actividad de los acarreadores.

Chen y Wilson (78) proponen que el grupo amino de la cabeza polar, tanto de la PE como de la PS tienen un papel importante en la activación del acarreador a través de la formación de hidrógeno entre el acarreador y el lípido. El PG también puede formar puentes de hidrógeno por su grupo hidroxilo de la cabeza polar con el acarreador, y también observaron un aumento del transporte, aunque menor que con PE. Estos autores encontraron que si se bloquea el grupo amino de las cabezas polares de PE y PS por trinitrofenilación o metilación, se reduce considerablemente la actividad del acarreador, lo cual es congruente con la hipótesis de que los puentes de hidrógeno son importantes en la interacción lípido-proteína.

No se pueden formar liposomas de pura PE, ya que la PE no puede asumir una forma vesicular estable a pH neutro, ya que a este pH la cabeza polar de la PE tiene carga parcial negativa (79,80), al igual que la PG que está ionizada con una carga negativa (78). La presencia de PC estabiliza a la PE en una configuración de bicapa donde se cree que se mezclan al azar (80).

No sólo son importantes las cabezas polares, sino también la composición de

los ácidos grasos de las cadenas de los fosfolípidos. Los monoinsaturados influyen en la actividad de algunos sistemas, siendo más activos los ácidos grasos con 16 a 18 carbonos; ésto puede deberse a que el largo de la cadena determina el grosor de la bicapa lipídica, aunque tampoco se descarta un efecto a nivel molecular (81).

También la carga de superficie influye en la actividad aparente de los translocadores, en *Saccharomyces carlsbergensis*, Cerbón (82) encontró que con la incorporación de PS a las células, los sistemas de transporte de alta afinidad se activan, mientras que los de baja afinidad se inhiben como resultado de la presencia de un alto potencial de superficie negativo.

No hay un consenso sobre el requerimiento de lípidos para obtener una máxima actividad de las proteínas transportadoras de membrana, pero sí se sabe que la naturaleza de las cabezas polares así como la longitud y otras características de las colas no polares son un factor crítico sobre el efecto en la actividad de los transportadores (83).

Los estudios realizados para definir el efecto de cada uno de los componentes de los fosfolípidos sobre las proteínas de la membrana, sin embargo, no ofrecen un esquema lógico a seguir para los experimentos de reconstitución. Por estas razones se probaron distintos factores, como el enriquecimiento de los liposomas de PC con PS o PE. Sucedió, por ejemplo, que en los liposomas con PE no se incorporaba la citocromo oxidasa por el método de dilución (74). En los trabajos donde se reporta incorporación, los métodos involucran la diálisis de detergentes, inicialmente desoxicolato y ahora generalmente octilglucósido (71, 75). En este trabajo, bajo esas

condiciones de diálisis se perdía la actividad de la ATPasa, y por lo tanto existía la posibilidad de que los acarreadores también se inactivaran, por lo que se prepararon liposomas con lípidos de *E.coli* que están constituidos por un 65% de PE, y se incorporó a la citocromo oxidasa por diálisis del octilglucósido para posteriormente fusionar los liposomas con la membrana. En cambio, en los liposomas con PS la citocromo oxidasa se incorporó muy bien por dilución, y se encontró además que había un mejor acoplamiento, medido por medio del control respiratorio, en comparación con los liposomas de PC. Eytan y Broza (84) observaron que la carga de los liposomas es importante para la unión inicial con la citocromo oxidasa, pero no es importante para la orientación de la enzima en ellos. La incorporación de la citocromo oxidasa en liposomas básicos la desnaturaliza parcialmente, y no es así en los liposomas acídicos.

Por estas razones, se decidió hacer los liposomas ya sea con una mezcla de PC/PS 30:1, que fue la proporción óptima encontrada para la citocromo oxidasa, o con lípidos de *E.coli*, en donde se obtenían controles respiratorios similares.

Con el sistema de vesículas se pudo medir el transporte en dos condiciones, una en la que predomina el potencial de membrana, con la simple adición del sustrato, y otra donde predomina el gradiente de pH, cuando se agrega valinomicina y potasio en el exterior. El uso de antibióticos y la presencia de ciertos cationes permite variar los componentes del potencial electroquímico; por ejemplo, la nigericina, a concentraciones muy bajas, debido al intercambio de protones del interior por el catión monovalente del exterior, colapsa el ΔpH y deja el $\Delta\psi$ intacto (85,86). El inconveniente de la nigericina es que actúa como desacoplante y en nuestras

condiciones no se logró encontrar una concentración no desacoplante.

Otra manera de obtener exclusivamente un potencial de membrana es, en ausencia de citocromo oxidasa, generar un potencial de difusión con valinomicina y potasio. Bajo estas condiciones se obtiene sólo un transporte transitorio que dura pocos segundos (87); muy probablemente, en estas condiciones, el potencial generado se disipa con rapidez. La incorporación de la citocromo oxidasa nos permitió obtener mejores resultados, posiblemente porque se establece un equilibrio de flujos entre el bombeo de protones y el transporte de los aminoácidos, que compensa tal vez el hecho de que las vesículas no estén perfectamente selladas.

Al mismo tiempo, tanto nuestros experimentos (65,91), como los de Opekarová y cols. (87), en donde el potencial generado es transitorio, y que permiten observar una entrada de los aminoácidos, seguida de una salida, indican que los sistemas de transporte de éstos, se encuentran orientados en ambos sentidos, promoviendo la entrada y la salida de los aminoácidos.

Los eventos del transporte en vesículas se miden convenientemente en el intervalo de segundos a minutos, debido a que el flujo de un soluto es más rápido cuanto más pequeño es el volumen de la vesícula (88). En nuestros experimentos, los eventos ocurrieron en el lapso de minutos, lo que permitió manipular las condiciones con relativa facilidad.

El transporte de la leucina se observó tanto en la condición en donde sólo existía un potencial de membrana, como en la que actuaba el gradiente de pH, siendo sólo un 10% la diferencia observada en las vesículas PC-PS, y de más del doble en las

vesículas de PE. Muy probablemente ambos componentes del potencial electroquímico son importantes para el transporte de leucina en estas levaduras, aunque en las vesículas de PE se transporta más con el ΔpH . Debido a que no se observa una diferencia en los gradientes de pH en ambos tipos de vesículas, según las estimaciones hechas con piranina, la diferencia se podría explicar como una activación del acarreador, según la propuesta de Chen y Wilson (78) o de acuerdo con el modelo propuesto por Ballarin-Denti y cols. (22) para el mecanismo de transporte de los cotransportadores, en donde primero se une el protón al acarreador, en el lado externo de la membrana; luego se puede unir o no un segundo protón, dependiendo de si el aminoácido se transporta con uno o dos protones y posteriormente se uniría el aminoácido y de esta manera el acarreador cruzaría la membrana liberando primero los protones del lado interno de la membrana y después el aminoácido, para dejar el translocador libre y listo para un nuevo ciclo de transporte. El acarreador, al estar más activo por la presencia de PE y tener un mayor gradiente de pH atraparía mas eficientemente a los protones, y por lo tanto, transportaría más rápidamente al aminoácido. A diferencia de otros microorganismos (70) donde se transporta sólo por el potencial.

En las vesículas de PC-PS, con la idea de que al aumentar el número de protones en el exterior aumentamos la contribución del gradiente de pH, se sometió a las vesículas a diferentes pHs externos. Esta idea se refuerza porque encontramos que el potencial de membrana se mantenía prácticamente igual a todos los pHs, tanto en las vesículas con el pH interno de 6.0 como de 7.0; sin embargo no se genera el

gradiente de pH a pH externo de 8.0, lo cual es una ventaja para trabajar exclusivamente con el potencial de membrana. Otra posibilidad, desde luego, es que los distintos fosfolípidos favorezcan alguna conformación o característica del acarreador, que lo vuelva más activo.

El transporte de leucina se observó a los diferentes pHs, en vesículas con un pH interno de 7.0. A pH externo de 6.0 el transporte fue 42% mayor que a 7.0. Se puede concluir que el gradiente de protones sí está generando un mayor transporte del aminoácido. A pH externo de 8 también hay transporte, aunque mediado tal vez por el potencial de membrana. El transporte a pH 8.0 fue 66% menor con respecto al transporte a pH externo de 6.0.

Las vesículas también fueron capaces de transportar aminoácidos cargados, como el ácido aspártico, ácido glutámico y arginina. Los aminoácidos acídicos se transportan bien en las vesículas enriquecidas con PS y en las de PE aún cuando estas tienen carga negativa, (79,80); esto puede deberse al incremento de la concentración de protones en la vecindad del acarreador (82). La distribución de protones está predicha por la teoría de Gouy-Chapman de la doble capa sobre los potenciales electrostáticos adyacentes a las membranas cargadas. Los aminoácidos ácidos son cotransportados con protones; según el modelo propuesto por Ballarin-Denti y cols. (22), ésto explicaría porqué un aminoácido con la misma carga que la carga de superficie de nuestra preparación de membranas, se puede transportar.

Con base en lo anterior, durante el proceso de transporte, la membrana se

despolarizaría por la entrada de protones en cotransporte con los aminoácidos, sobre todo los neutros y los básicos, y con ello, también el medio externo se alcalinizaría. Sería posible que esta alcalinización se observara con técnicas semejantes a las que existen para la detección de $\Delta\Psi$ y ΔpH . Sin embargo, si los protones desaparecen del medio acompañando al soluto, su desaparición puede pasar desapercibida, ya sea porque la solución externa tiene una alta capacidad amortiguadora, o porque la citocromo oxidasa responde inmediatamente a los cambios de pH bombeando más protones al exterior. Para probar la primera posibilidad se decidió disminuir la concentración del amortiguador que era de 50 mM a 5 mM. Desde el punto de vista metodológico no se detectó ningún cambio en el $\Delta\Psi$ o en el ΔpH al transportarse la leucina. Sin embargo, se pudieron observar cambios en el ΔpH durante el transporte del ácido glutámico a concentraciones entre 60 y 100 μM ; a concentraciones mayores, la recuperación que se observa tal vez se deba a un aumento en la actividad de la citocromo oxidasa para compensar el movimiento de protones hacia adentro durante el transporte. Se pudo observar que la actividad de la citocromo oxidasa se incrementó un 28 % en presencia de las altas concentraciones del ácido glutámico que corresponden a las concentraciones donde se observa la recuperación del ΔpH .

Con el ácido glutámico los resultados parecen indicar que en ausencia del potencial de membrana existe una entrada menor del aminoácido en ambos tipos de vesículas. Esto no es lo que se esperaría, ya que el aminoácido, al tener carga negativa al igual que el potencial, debería entrar más fácilmente al anularse el potencial. Sin embargo, la disminución del transporte en ausencia del potencial de

membrana es pequeña, y ello tal vez se deba a que se utilizan ambos componentes del potencial electroquímico para el transporte.

En el caso de la arginina, en ausencia de un potencial de membrana no hubo transporte, y con los fluoróforos se pudo detectar una disminución del $\Delta\Psi$ con la adición del aminoácido mientras que el ΔpH no se modificó. Parece ser que el transporte está mediado principalmente por la parte eléctrica del potencial electroquímico, como se reportó para *Chromatiun vinosum* (69). Estos resultados estarían a favor de que la arginina se transporta por un sistema uniportador con un potencial negativo en el interior que provee la energía para la entrada del aminoácido cargado positivamente sin que haya un acoplamiento con un cotransporte con protones. Sin embargo, existe un reporte indicando que en *Candida utilis* la arginina se transporta con un protón (4).

Se supuso que la arginina podía entrar por la permeasa general, ya que estábamos utilizando concentraciones cercanas al valor de la K_m para este acarreador. Sin embargo, al hacer experimentos de competencia, se observó que en presencia de leucina no se inhibe el transporte de arginina, por lo que parecen ser dos sistemas de transporte diferentes. Esto es similar a lo observado con *P.cyclopium* (89). Es posible que la arginina esté entrando por algún acarreador específico, tal vez semejante al de alta afinidad de las células cultivadas en ácido oleico por Keenan y Rose (31).

Por otra parte, en presencia de leucina se inhibe la entrada del aspártico y viceversa, lo que puede indicar que están entrando por el mismo acarreador, como sucede en el caso de *Penicillium cyclopium*, en donde el transporte de leucina y ácido

glutámico se sobreponen en especificidad (89). Se piensa que en este caso está actuando la permeasa general, por donde también se ha visto que entran los aminoácidos dicarboxílicos (12,16), aunque Grenson (6) ha propuesto que solo entran los básicos y los neutros.

Por razones que no hemos podido dilucidar se obtuvieron resultados incongruentes con el efecto de la valinomicina sobre el transporte del ácido aspártico, tanto en las vesículas de PC-PS, como en las PE, y lo mismo le sucedió a otros autores sin tener una explicación de esto (69).

La información que podemos obtener sobre los mecanismos cinéticos del transporte mediado por acarreadores pueden derivarse de la medición de la velocidad del proceso en función de variables experimentales apropiadas. Las características cinéticas de los sistemas de transporte se encuentran relativamente bien estudiadas aunque todavía existen dudas sobre la especificidad de algunos de éstos sistemas por los sustratos. Sin embargo, en el transporte a través de la membrana es más difícil establecer la dependencia exacta de la velocidad del transporte en diferentes condiciones o factores. El problema surge de la dependencia del flujo del soluto por la composición de las dos fases acuosas y de la dificultad de conocer y controlar las fuerzas o gradientes transmembranales. No existe un acuerdo sobre los valores medidos de $\Delta\Psi$ y ΔpH en la levadura, por lo que no se ha podido predecir cuantitativamente la acumulación de protones en el transporte de aminoácidos. El consenso es que estos transportes se llevan a cabo junto con protones, pero aún quedan muchas preguntas sin contestar sobre la fisiología y los mecanismos del

cotransporte. Además, el análisis del flujo de solutos en términos de las propiedades del acarreador pueden complicarse por la heterogeneidad de las vesículas (88). Esta heterogeneidad reside en que, aunque las vesículas siempre se preparen igual, no se puede saber si todas poseen la misma cantidad de membrana plasmática y por lo tanto, la misma cantidad de acarreadores, o la misma cantidad de citocromo oxidasa, o si existen liposomas a los cuales no se les incorporó membrana, etc.

De todas formas, los resultados señalan algunos hechos interesantes, y al menos abren una nueva posibilidad de estudio de los sistemas de transporte. Tal vez los datos más importantes se refieran al hecho de que la arginina parece transportarse por un sistema que depende del $\Delta\Psi$, y no, del ΔpH . Además, su transporte no parece inhibirse por la presencia de un aminoácido neutro, la leucina. Esta, a su vez, sí compite con los aminoácidos acídicos. De aquí resulta que tal vez los aminoácidos básicos entren, no sólo por un sistema de transporte diferente, sino también por un mecanismo distinto al de los neutros y los acídicos.

CONCLUSIONES

-El sistema de vesículas desarrollado permitió tener un modelo con el cual se podían hacer estudios de transporte a través de una membrana sin que el metabolismo de la célula interviniera.

-La incorporación de la citocromo oxidasa a las vesículas, ya sea por dilución o por diálisis del detergente, proporcionó una herramienta útil para la generación de un $\Delta\mu_{H^+}$ con la misma polaridad que el de la célula (negativo y alcalino en el interior) que podía proporcionar la energía necesaria para el transporte secundario de aminoácidos.

-Con la incorporación de lípidos de *E.coli* a las vesículas se lograron tasas de acumulación de aminoácidos más altas que las obtenidas con asolectina.

-La leucina se transportó tanto en presencia de un potencial de membrana sin ΔpH o de un gradiente de pH sin $\Delta\Psi$, por lo que ambos componentes del potencial electroquímico contribuyen de igual manera en el transporte de este aminoácido.

-El ácido glutámico, en presencia exclusivamente de un gradiente de pH se transportó menos que en presencia sólo del potencial de membrana en ambos tipos de vesículas.

Parece ser que se utilizan ambos componentes del potencial electroquímico, contribuyendo tal vez un poco más el potencial de membrana.

-La arginina no se transportó en ausencia de un potencial de membrana, y el gradiente de pH, en este caso, no jugó un papel importante en el transporte, por lo que el transporte de arginina está mediado exclusivamente por el potencial de membrana.

-El transporte de los aminoácidos se lleva a cabo básicamente por la permeasa general y la leucina compitió por la entrada de ácido aspártico y viceversa. Con arginina no hubo competencia, por lo que tal vez este aminoácido esté entrando por su acarreador específico.

BIBLIOGRAFIA

- 1) Large, P.J. 1986. Degradation of organic nitrogen components by yeast. *Yeast*. 2:1 1-34p.
- 2) Rose, A.H. and Harrison, J.S. 1989. *The Yeast*. vol.3. ed.2. 635p.
- 3) Rose, A.H. and Harrison, J.S. 1987. *The Yeast*. vol.2 ed.2 308p.
- 4) Horak, J. 1986. Aminoacid transport in eucariotic microorganism. *Biochim. Biophys. Acta*. 864. 223-256p.
- 5) Eddy, A.A. 1982. Mechanism of solute transport in selected eukaryotic microorganism *Adv. Microbiol. Phys.* 23. 1-78.
- 6) Grenson, M, et.al. 1970. Multiplicity of the aminoacid permeases in *Saccharomyces cerevisiae*. IV: Evidence for a general aminoacid permease. *J. of Bacteriol.* 103:3. 770-777.
- 7) Grenson, M. y Acheroy, B. 1982. Mutations affecting the activity and regulation of the general aminoacid permease of *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch. Int. Physiol. Biochem.* 80. 184-185.
- 8) Grenson, M, 1983. Inactivation-reactivation proces and repression of permease and other ammonia sensitive permeases in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur. J. Biochem.* 133. 135-139.
- 9) Jauniaux, M. and Grenson, M. 1990. GAP1, the general aminoacid permease gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur. J. Biochem.* 190. 39-44.
- 10) Ramos, E.H. 1977. Some properties of l-[¹⁴C]leucine in *Saccharomyces ellipsoideus*. *Biochim. Biophys. Acta*. 467. 220-237p.
- 11) Poole, S.P. et.al. 1985. The transport of L-glutamate by *Rhizobium leguminosarium* involves a common aminoacid carrier. *J. Gen. Microbiol.* 131. 1441-1448p.
- 12) Darte, C. and Grenson, M. 1975 *Biochem. Biophys. Res. Com.* 67. 1028p.
- 13) Lasko, P.F. and Brandriss, M.C. 1981. Proline transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. of Bacteriol.* 148. 241-247.
- 14) Woodward, J.R. and Kornberg, H.L. 1980. Membrane proteins associated with aminoacid transport by yeast (*Saccharomyces cerevisiae*). *Biochem. J.* 192, 659-664.

- 15) Grenson, M. 1966. Multiplicity of the aminoacid permeases in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim. Biophys. Acta* 127, 339.
- 16) Kotyk, A. et al. 1971. Uptake of aminoacids by actidione-treated yeast cells. II Effect of incubation conditions and metabolic inhibitors. *Folia Microbiol.* 16, 445-450.
- 17) Sychrová, H. et al. 1989. Transport of l-Lysine in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Biochem. Biophys. Acta.* 978. 203-208.
- 18) Crabeel, M. and Grenson, M. 1970. Regulation of histidine uptake by specific feed-back inhibition of two histidine permeases in *Saccharomyces cerevisiae*. *EUR J. of Biochem.* 14, 197-204.
- 19) Calderbank, J. et al. 1984. Accumulation of aminoacids by *Saccharomyces cerevisiae* Y185 with phospholipids enriched in different fatty-acids residues: A statistical analysis of data. *J. of General Microbiol.* 130, 2817-2824.
- 20) Eddy, A.A. et al. 1970. The concentration of aminoacids by yeast cells depleted of adenosine triphosphate. *Biochem. J.* 120, 853-858.
- 21) Kotyk, A. and Rihová, L. 1972. Transport of α aminoisobutyric acid in *Saccharomyces cerevisiae*. Feedback control. *Biochem. Biophys. Acta* 288, 380-389.
- 22) Ballarin-Denti. et al. 1984. Kinetics and pH dependence of glycine proton symport in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem. Biophys. Acta.* 778, 1-16.
- 23) Calderbank, J. et al. 1985. Plasma membrane phospholipids unsaturation affects expression of the General Aminoacid Permease in *Saccharomyces cerevisiae* Y 185. *J. of General Microbiol.* 131, 57-65.
- 24) Magana-Schwencke, N. and Schwencke, J. 1969. A proline transport system in *Saccharomyces chevalieri*. *Biochem. Biophys. Acta.* 173, 313-323.
- 25) Horak, J. and Rihová, L. 1982. L-proline transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem. Biophys. Acta.* 691. 144-147.
- 26) Bussey, H. and Umbager, H.E. 1970. Biosynthesis of the branched-chain aminoacid in yeast: a trifluoroleucine resistant mutant with altered regulation of leucine uptake *J. of Bacteriol.* 103, 286-294.
- 27) Ramos, E.H. et al. 1980. Kinetics of l-[¹⁴C]leucine transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem. Biophys. Acta.* 599, 214.
- 28) Kotliar, N. and Ramos, E.H. 1983. Systems of l-leucine transport into *Saccharomyces*

- cerevisiae* protoplast. Biochem. Biophys. Acta. 734, 378.
- 29) Opekarová, M. et al. 1975. Arginine building protein from *Saccharomyces cerevisiae*. Eur. J. of Biochem. 59, 373-379.
 - 30) Chan, P.Y. and Cossing, E.A. 1976. J. of Cell. and Comp. Physiol. 17, 311
 - 31) Keenan, M.H. and Rose, A.H. 1979. Plasma membrane lipid unsaturation can affect the kinetics of solute accumulation by *Saccharomyces cerevisiae*. FEMS Microbiol. Letters. 6, 133-137.
 - 32) Serrano, R. 1988. Structure and function of H⁺ translocating ATPase. Biochem. Biophys. Acta. 947. 1-28.
 - 33) Davis, C.V. and Hammes, G.G. 1988. Topology of the yeast plasma membrane H⁺ Translocating ATPase. J. Biol. Chem. 264:1 370-374.
 - 34) Serrano, R. 1988. Purification and reconstitution. Methods in Enzymology 157. 533.
 - 35) Addison, R. 1986. Primary structure of the *Neurospora* plasma membrane H⁺ ATPase deduced from the gene sequence. J. Biol. Chem. 261:32. 14896-14901.
 - 36) Hager, K. et al. 1986. Amino acid sequence of plasma membrane ATPase of *Neurospora crassa* : deduced from genomic and cDNA sequence. Proc. Natl. Acad. Sci. 83. 7693-7697.
 - 37) Dufour, J.P. et al. 1988. Plasma membrane ATPase from the yeast *Schizosaccharomyces pombe*. Methods in Enzymology. 157. 513.
 - 38) Peña, A. 1975. Studies on the mechanism of K⁺ transport in yeast. Arch. Biochem. Biophys. 167. 397-409.
 - 39) Borbolla, M. and Peña, A. 1980. Characteristics of Ca⁺⁺ uptake by yeast. J. Memb. Biol. 54. 149-156.
 - 40) Peña, A. 1978. Effect of ethidium bromide on Ca⁺⁺ uptake in yeast. J. Memb. Biol. 42. 199-213.
 - 41) Seaston, A. et al. 1973. The absorption of H⁺ with specific amino acids and carbohydrate in yeast. Biochem. J. 134. 1031-1043.
 - 42) Cockburn, M. et al. 1975. The stoichiometry of the absorption of H⁺ with phosphate and l-glutamate by yeast of genus *Saccharomyces cerevisiae*. Biochem. J. 146. 705-712.
 - 43) Van den Broek, P.J.A. and Van Steveninck, J. 1982. Kinetic analysis of H⁺ methyl D-

- thiogalactoside symport in *Saccharomyces fragilis*. Biochem. Biophys. Acta. 693. 213-220.
- 44) Schuddemat, M. et al. 1988. The influence of ATP on sugar uptake mediated by the constitutive glucose carrier. Biochem. Biophys. Acta. 937. 81-87.
- 45) Rothstein, A. and Bruce, M. 1958 J. Cell. Comp. Physiol. 51. 439-455.
- 46) Opekarová, M. and Sigler, K. 1985. CO₂ dependent K⁺ efflux in yeast utilizing endogenous substrates. Cell. and Mol. Biol. 31:3. 195-200.
- 47) Eddy, A.A. and Nowacki, J.A. 1971. Stoichiometrical proton and potassium ion movement accompanying the absorption of amino acids by the yeast *Saccharomyces carlsbergensis*. Biochem. J. 122. 701-711.
- 48) Seaston, A. et al. 1976. The concentration of leucine by preparations of yeast *Saccharomyces carlsbergensis* depleted of adenosine triphosphate. Biochem. J. 154. 669-676.
- 49) Peña, A. et al. 1972. Effects of the pH of the incubation medium on glycolysis and respiration in yeast. Arch. Biochem. Biophys. 153; 413-425
- 50) De la Peña, P. et al. 1982. The electrochemical proton gradient of *Saccharomyces*. The role of potassium. Eur. J. Biochem. 123. 447-453.
- 51) Peña, A. et al. 1984. The use of a cyanine dye in measuring membrane potential in yeast. Arch. Biochem. Biophys. 231: 217-225.
- 52) Ohsumi, Y. and Anraku, Y. 1983. Calcium transport driven by a proton motive force in vacuolar membrane vesicles of *Saccharomyces cerevisiae*. J. Biol. Chem. 258:9. 5614-5617.
- 53) Kotyk, A. 1970. Fol. Microbiol. 16. 451-453.
- 54) Gómez, F. 1984. El transporte de leucina en la levadura. Tesis de Licenciatura. Fac. Ciencias. UNAM.
- 55) Kotyk, A. 1982. Transport protein synthesis in non growing yeast cells. Biochem. Biophys. Acta. 698. 243-251.
- 56) Horák, J. et al. 1981. Energization of sulfate transport in yeast. Biochim. Biophys. Acta. 649. 436-440.
- 57) Scarborough, G.A. 1975. Isolation and characterization of *Neurospora crassa* plasma

- membrane. J. Biol. Chem. 250. 1106-1111.
- 58) Scarborough, G.A. 1976. The *Neurospora* plasma membrane ATPase is an electrogenic pump. Proc. Natl. Acad. Sci. 73:5. 1485-1488.
 - 59) Perlin, D.S. et al. 1984. Electrogenic H⁺ translocation by the plasma membrane ATPase of *Neurospora*. J. Biol. Chem. 259, 7884-7892.
 - 60) Franzusoff, A. and Cirillo, V. 1983. Glucose transport activity in isolated plasma membrane vesicles from *Saccharomyces cerevisiae*. J. Biol. Chem. 258. 3608-3614.
 - 61) Ahlers, J. 1984. Effects of different salts on the plasma membrane ATPase and on proton transport in yeast. Can. J. Biochem. Cell. Biol. 62. 998-1005.
 - 62) Nakazato, K. et al. 1988. Membrane potential in liposomes measured by the transmembrane distribution of ⁸⁶Rb, tetraphenylphosphonium or triphenylmethyl phosphonium. Effect of cholesterol in lipid bilayer. Biochim. Biophys. Acta. 946.143-150.
 - 63) Waggoner, A.S. 1979. Dye indicators of membrane potential. Ann. Rev. Biophys. Bioeng. 8. 47-68.
 - 64) Bashford, C.L. and Smith, J.C. 1979. The use of optical probes to monitor membrane potential. Methods in enzymology. 55. 569-586.
 - 65) Calahorra, M. et al. 1987. Electrochemical potential and ion transport in vesicles of yeast plasma membrane. Biochim. Biophys. Acta. 899. 229-238.
 - 66) Slavik, J. 1982. Intracellular pH of yeast cells measured with fluorescent probes. FEBS letters. 140:1. 22-26.
 - 67) Theuvenet, A.P.R. et al. 1983. 9-aminoacridine, a fluorescent probe of the thiamine carrier in yeast cells. Biochim. Biophys. Acta 730. 255-262.
 - 68) Clement, N. and Gould, M. 1981. Pyranine (8-hydroxy-1,3,6-pyrene trisulfonate) as a probe of internal aqueous hydrogen ion concentration in phospholipid vesicles. Biochemistry. 20, 1534-1538.
 - 69) Kim, Y. and Knaff, D.B. 1988. Lysine and arginine transport in the photosynthetic bacterium *Chromatium vinosum*. Arch. of Biochem. Biophys. 260:1. 134-138.
 - 70) Wakabayashi, K. et al. 1988. Leucine transport in a facultatively alkalophilic *Bacillus*. Arch. Biochem and Biophys. 262:1. 19-26.
 - 71) Driessen, A.J.M. et al. 1988. Lipid requirement of the branched chain amino acid

- transport system of *Streptococcus cremoris*. Biochemistry. 27. 865-872.
- 72) Lowry, O. et al. Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193. 265-275.
- 73) Fiske, C.A. and Subbarow, Y. 1925. The colorimetric determination of phosphorous. J. Biol. Chem. 177. 751-766.
- 74) Ramirez, J. et al. 1987. Variation on the dilution method for reconstituting cytochrome c oxidase into membrane vesicles. Analyt. Biochem. 163, 100-106.
- 75) Van Leeuwen, C.C.M. et al. 1991. Proton motive force driven d-galactose transport in plasma membrane vesicles from the yeast *Kluyveromyces marxianus*. J. Biol. Chem. 266-19. 12146-12151.
- 76) Bell, D.H. 1983. Transmembrane pH gradient and functional heterogeneity in reconstituted vesicle systems. Biochem. Biophys. Acta. 725, 368-375.
- 77) Calahorra, M. 1986. Generación de $\Delta\psi$, ΔpH y transporte de K^+ y Ca^{++} en vesículas de membrana plasmática de *Saccharomyces cerevisiae*. Tesis de Maestría. 53pp
- 78) Chen, C.C. and Wilson, T.H. 1984. The phospholipid requirement for activity of the lactose carrier of *Escherichia coli*. J. Biol. Chem. 259. 10150-10158.
- 79) Uratani, Y. and Aiyama, A. 1986. Effect of Phospholipid composition on activity of sodium-dependent leucine transport system in *Pseudomonas aeruginosa*. J. Biol Chem. 261:12. 5450-5454.
- 80) Kolber, M and Haynes, D. 1979. Evidence for a role of phosphatidylethanolamine as a modulator of membrane-membrane contact. J. Membr. Biol. 48. 95-114.
- 81) Uratani, Y. et al. 1987. Effect of lipid acyl chain length on activity of sodium-dependent leucine transport system in *Pseudomonas aeruginosa*. J. Biol. Chem. 262:35. 16914-16919.
- 82) Cerbón, J. and Calderón, V. 1990. Proton linked transport systems as sensors of changes in the membrane surface potential. Biochem. Biophys. Acta. 1028. 261-267.
- 83) Carruthers, A. and Melchior, D. 1986. How bilayer lipids affect membrane protein activity. TIBS. 11. 331-335.
- 84) Eytan, G. and Broza, R. 1978. Role of charge and fluidity in the incorporation of cytochrome oxidase into liposomes. J. Biol. Chem. 253:9. 3196-3202.

- 85) Driessen, A.J.M. et al. 1986. Functional incorporation of beef heart cytochrome c oxidase into membranes of *Streptococcus cremoris*. *Eur. J. Biochem.* 154. 617-624.
- 86) Driessen, A.J.M. et al. 1985. Incorporation of beef heart cytochrome c oxidase as a proton motive force generating mechanism in bacterial membrane vesicles. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 82. 7555-7559.
- 87) Opekarová, M. et al. 1987. Proton motive force driven leucine uptake in yeast plasma membrane vesicles. *FEBS Letters* 213:1.45-48.
- 88) Hopfer, U. 1984. Criticism and limitations of current transport studies with isolated membrane vesicles in: *Mechanism of intestinal electrolyte transport and regulation by calcium*. Alan R. Liss Inc. N.Y. 27-33.
- 89) Roos, W. 1989. Kinetic properties, nutrient dependent regulation and energy coupling of amino acid transport systems in *Penicillium cyclopium* *Biochem. Biophys. Acta.* 978. 119-133.
- 90) 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.
- 91) Calahorra, M. et al. 1989. Leucine transport in plasma membrane vesicles of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Letters.* 247:2. 235-238.

BBA 73552

Electrochemical potential and ion transport in vesicles of yeast plasma membrane

Martha Calahorra, Jorge Ramírez, S. Mónica Clemente and Antonio Peña

Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado 70-600,
04510 México, D.F. (Mexico)

(Received 11 December 1986)

Key words: Ion transport; Electrochemical potential; Fluorescence; Plasma membrane; (*S. cerevisiae*)

Vesicles from yeast plasma membrane were prepared according to Franzusoff and Cirillo ((1983) *J. Biol. Chem.* 258, 3608), with slight modifications. When Mg-ATP was added, this preparation was able to generate a membrane potential, that was sensitive to inhibitors of the yeast H⁺-ATPase and uncouplers, and could be decreased by the addition of permeant anions, as measured by the fluorescence changes of the dye oxonol V. The addition of ATP could also generate a pH gradient, detectable by the fluorescence changes of the monitor aminochloromethoxyacridine. This gradient was sensitive to inhibitors of ATPase and uncouplers, and could be increased by the addition of permeant anions to the incubation mixture. When the vesicles were loaded with KCl, an increased rate of K⁺ efflux was produced upon the addition of ATP. Cytochrome oxidase from bovine heart could be reconstituted into the vesicles and was shown to generate a membrane potential difference, negative inside, evidenced by the fluorescence quenching of the cyanide dipropylthiacarbocyanine and the uptake of tetraphenylphosphonium. Besides, in these vesicles, K⁺ and Rb⁺, but not Na⁺ or NH₄⁺ could decrease the quenching of fluorescence and the uptake of tetraphenylphosphonium produced when the electron-donor system was present. In the vesicles in which cytochrome oxidase was incorporated, upon the addition of cytochrome c and ascorbate, the uptake of ⁸⁶Rb⁺ could be demonstrated also. This uptake was found to be saturable and inhibited by K⁺, and to a lesser degree by Na⁺. The results obtained indicate that these vesicles are reasonably sealed and capable of generating and maintaining a membrane potential. The membrane potential could be used to drive ions across the membrane of the vesicles, indicating the presence and functionality of the monovalent cation carrier. The vesicles, in general terms seem to be suitable for studying transport of ions and metabolites in yeast.

Abbreviations: Mes, 4-morpholineethanesulfonic acid; 1799, a 2:1 adduct of hexafluoroacetone and acetone; DCCD, dicyclohexylcarbodiimide; EDTA, ethylenediamine tetraacetic acid; FCCP, carbonylcyanide trifluoromethoxyphenylhydrazone; CCCP, carbonylcyanide *m*-chlorophenylhydrazone; PC, phosphatidylcholine.

Correspondence: A. Peña, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado 70-600, 04510 México, DF, México.

Introduction

The plasma membrane of yeast has a H⁺-ATPase that generates an electrochemical potential gradient which drives different transport systems [1]. This ATPase has been characterized and isolated from several species of yeast [2-5], and from *Neurospora crassa* [6]. In all kinds of fungi, the general characteristics of the enzyme are simi-

lar [7], with a molecular mass of 105 000 kDa, and an optimal pH around 6.0, differently to the mitochondrial ATPase of these microorganisms, which has an optimum pH around 9.0. Besides, it is inhibited by diethylstilbestrol and vanadate, and not by oligomycin and azide. Both ATPases are inhibited by DCCD and Dio 9 [2,7]. The gene of this ATPase has been cloned and sequenced [8].

It has been possible to reconstitute the isolated plasma membrane ATPase of yeast and fungi into liposomes [9-12]. By this procedure, or by using inside-out vesicles from *Neurospora crassa* [13,14], it was possible to show that the enzyme works as a proton pump capable of generating an electrochemical potential gradient, that has been postulated as responsible for driving the transport of several metabolites, such as Ca^{2+} , K^+ , amino acids and sugars [15-19].

With several microorganisms and other biological systems, the use of membrane vesicles has been also useful in the characterization of solute transport. In the fungus *Neurospora crassa*, its plasma membrane can be vesiculated by rather simple procedures [14,20]. With yeast, and especially in the case of *Saccharomyces cerevisiae*, it had been difficult to obtain a preparation of sealed plasma membrane vesicles. These preparations [21], when tested in our laboratory, gave low ATPase activities and were not sealed (unpublished results). However, Franzusoff and Cirillo [22], by a modification of the procedure of Fuhrmann et al. [21], obtained plasma membranes from *Saccharomyces cerevisiae* and prepared from them vesicles that could be used to study the transport of sugars. Another preparation reported recently by Ahlers [23], appears to be sealed and might be useful also for studies on solute transport.

Since the study of Matsushita et al. [24], a bacterial cytochrome oxidase could be incorporated into vesicles of *Escherichia coli*, to drive the transport of lactose by generating a membrane potential. Recently, Driessen et al. [25] and Hirata et al. [26], achieved similar results with vesicles of *Streptococcus cremoris*, and a thermophilic bacterium, respectively, and could demonstrate the uptake of amino acids, driven by the electrochemical potential generated by cytochrome *c* oxidase.

In this report, results are presented of an attempt to determine the ability of vesicles prepared

by the procedure of Franzusoff and Cirillo [22], to generate a membrane potential by different means, and that of transporting ions.

Materials and Methods

Cells. *Saccharomyces cerevisiae* was obtained commercially (La Azteca, S.A.). The cells (30 g of packed cells) were incubated for 8 h at 30°C under vigorous aeration in 1 l of the medium described by De Kloet et al. [27], placed in a 2 l Erlenmeyer flask. After this incubation, the cells were centrifuged and washed twice by centrifugation with deionized water, and resuspended in 400 ml of water. They were then aerated overnight (15 to 18 h) by bubbling air through the suspension in a glass cylinder. In the morning, the cells were centrifuged and washed once with water.

Preparation of plasma membranes. They were obtained according to the procedure of Franzusoff and Cirillo [22], with an additional resuspension of the membranes in buffer B (10 mM Tris, 1 mM EDTA, 2 mM 2-mercaptoethanol, 0.1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 0.02% NaN_3 , pH 7.5) at the end of the procedure, and centrifugation at 140 000 $\times g$ during 40 min, resuspending them finally at a ratio of 10 to 20 mg of protein per ml of the same buffer. The additional washing was in order to eliminate the pyrophosphatase and phosphatase activities found.

Preparation of the plasma membrane vesicles. The procedure of Franzusoff and Cirillo [22] was followed with minor modifications. Liposomes of acetone-washed phosphatidylcholine (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) were prepared by sonication (Branson B-12 sonicator) until the solution was clear, usually for 40 s at a concentration of 47.6 mg per ml in 10 mM Mes-triethanolamine buffer (pH 6.5), 1 mM EDTA, that contained besides either 20 mM sucrose, or 10 mM KCl. Then, 31.5 mg of liposome lipid was mixed with 4 mg of protein, to a final volume of 1.0 ml of the same medium used to prepare the liposomes. The mixture was stirred and twice frozen in an acetone bath cooled with solid CO_2 , and thawed afterwards at room temperature. Then the mixture was sonicated in a bath sonicator (Branson 32) for variable times, usually 10 min, unless specified otherwise, until the mixture clarified. When cyto-

chrom used, phosphoethane

Pre cytochrome used was ac with th

Enz measu

ing 10 10 mM mM st

The re and th 30°C.

of 100 the tul

were c measur

[29].

Use membr

followe

oxonol 9-amin

resp. T to a cu

sucrose To foll

tial ger

oxonol started

lengths: nm. In

was inc ed neg;

cence q The ves

contain ascorba

The flu 540-58

ture co aminoc

started wavelen

and 440

chrome oxidase was used, the same procedure was used, but the medium was changed to 100 mM phosphoric acid, neutralized to pH 7.0 with triethanolamine.

Preparation and incorporation into the vesicles of cytochrome oxidase from bovine heart. The methods used were described elsewhere [28]. Reconstitution was achieved by mixing the enzyme preparation with the vesicles.

Enzymatic assays. The ATPase activity was measured in 350 μ l of a reaction medium containing 10 mM Mes-triethanolamine buffer (pH 6.5), 10 mM $MgSO_4$, 6 mM ATP, 1 mM EDTA and 20 mM sucrose. The amount of protein was 100 μ g. The reaction was started by the addition of ATP and the mixture was incubated for 10 min at 30°C. The reaction was stopped by the addition of 100 μ l of 30 percent trichloroacetic acid and the tubes were transferred to an ice bath. They were centrifuged, and hydrolyzed phosphate was measured by the method of Fiske and SubbaRow [29].

Use of fluorescent probes. The generation of a membrane potential and of a pH gradient were followed by the quenching of the fluorescence of oxonol V [30,31] or dipropylthiacarbocyanine and 9-amino-6-chloro-2-methoxyacridine [9,10,23], resp. The vesicles (200 μ g protein/ml) were added to a cuvette containing a buffer, and either 20 mM sucrose, 10 mM KCl, or 10 mM potassium acetate. To follow the internally positive membrane potential generated by ATP, 5 mM $MgSO_4$ and 2 μ M oxonol V were included, and the reaction was started by the addition of 5 mM ATP. The wavelengths used to measure fluorescence were 580–640 nm. In the vesicles to which cytochrome oxidase was incorporated, the membrane potential, expected negative inside, was followed by the fluorescence quenching of dipropylthiacarbocyanine [32]. The vesicles were added to the incubation medium containing the cyanine, followed by cytochrome *c*, ascorbate, and tetramethyl-*p*-phenylenediamine. The fluorescence of the cyanine was followed at 540–580 nm. To follow the pH changes, the mixture contained 1.5 mM $MgSO_4$ and 1.5 μ M aminochloromethoxyacridine; the reaction was started by the addition of 1.5 mM ATP. The wavelengths for excitation and emission were 400 and 440 nm, respectively.

Measurement of 3H -tetraphenylphosphonium uptake. The vesicles (7.5 μ g protein) in a final volume of 500 μ l were incubated for 5 min with 3H -tetraphenylphosphonium. After incubation, they were passed through a Sephadex G-50 fine column, as described for the measurement of ion uptake (see below). The radioactivity of the vesicles was then measured in a scintillation counter.

Measurement of ion transport. To measure K^+ efflux, vesicles were prepared in a medium with 50 mM KCl, and passed through a column of 22 \times 0.6 cm of Sephadex G-50 fine, to eliminate external potassium. Then they were placed in a K^+ -free medium, and the efflux of the cation was followed by means of a K^+ electrode (Orion), connected to a pH meter and a recorder. To measure the influx, the vesicles were incubated as indicated under individual experiments in the presence of $^{86}Rb^+$ and, at the indicated times, samples were taken and placed on top of an insulin syringe filled with 1 ml of a suspension of Sephadex G-50, fine, from which excess liquid was previously removed by suction. Then the syringe, placed inside a test tube, was centrifuged for 2 min to 3500 rpm. The volume coming out of the syringe was measured to correct results for dilution, an aliquot was taken and placed in a filter paper to dry. The filter paper was then placed in a scintillation vial with a scintillator and counted.

Protein determination. Protein was measured by the technique of Lowry et al. [33], with bovine serum albumin as standard.

Reagents. Most reagents were obtained from Sigma Chemical Co., St. Louis, MO. Oxonol V and dipropylthiacarbocyanine were obtained from Molecular Probes, Junction City, OR. Sephadex was obtained from Pharmacia Fine Chemicals. Aminochloromethoxyacridine was a kind gift from Dr. P. Overath, Max Planck Institute for Biology, Tubingen, 1799 was kindly provided by Dr. P.G. Heytler, DuPont de Nemours, Wilmington, DE. 3H -Tetraphenylphosphonium was kindly donated by Drs. H.R. Kaback and N. Carrasco, Roche Institute of Molecular Biology, Nutley, NJ.

Results

The plasma membrane obtained by the method of Franzusoff and Cirillo [22] was found to con-

tain, besides the ATPase, substantial phosphatase activity that could be evidenced by using ADP and *p*-nitrophenyl phosphate as substrates, as well as a pyrophosphatase, tested with pyrophosphate as substrate. These activities could be inhibited by molybdate and NaF, respectively, and were eliminated by an additional washing by centrifugation at $140\,000 \times g$ during 40 min (results are not shown). The ATPase activity of the plasma membrane preparation, measured at pH 6.5, varied between 0.6 and $1.0 \mu\text{mol} \cdot (\text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1})$ (not shown). This activity was similar to that of other reported preparations [7,22,23], and was inhibited between 5 and 10 percent with $10 \mu\text{g}$ of oligomycin, varying from one preparation to another. Effective inhibitors were vanadate and diethylstilbestrol; triphenyltin and DCCD were partially effective, as found later with vesicles (Table I), even if used at rather high concentrations, or if, as in the case of DCCD, the membranes were preincubated for 20 min with the inhibitor. Azide was ineffective as an inhibitor.

Differently to the report of Franzusoff and Cirillo [22], sonication for 7 s after freezing and thawing twice, did not produce functional vesicles. It was also observed that, with the recommended

TABLE I
ATPase ACTIVITY OF PLASMA MEMBRANE VESICLES FROM YEAST, PREPARED ACCORDING TO FRANZUSOFF AND CIRILLO [22]. EFFECTS OF INHIBITORS

The activity was measured as described under Methods. The inhibitors used were added at the indicated concentrations 2 min before starting the reaction with ATP, except for DCCD, that was preincubated 20 min with the vesicles. Results are the mean of two experiments.

Experimental conditions	Activity	
	specific ($\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$)	relative (% of control)
Control	936	100
Oligomycin, $10 \mu\text{g}$	893	95
$100 \mu\text{M}$ vanadate	92	10
$300 \mu\text{M}$ NaN_3	908	97
$500 \mu\text{M}$ diethylstilbestrol	324	35
$500 \mu\text{M}$ triphenyltin	777	83
$143 \mu\text{M}$ DCCD	797	85
$10 \mu\text{M}$ FCCP	1008	108
Nigericin, $10 \mu\text{g} + 10 \text{mM}$ KCl	1033	110

procedure, the vesicles were not able to generate a potential gradient. This problem, however, seemed to be due to the sonicator used (Branson B32), and could be solved with longer sonication times, in the order of minutes. After sonicating for 3 to 5 min the fusion of the liposomes and the plasma membranes was shown by centrifugation in a Percoll gradient from 1.019 to $1.14 \text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ for 45 min at $70\,000 \times g$ (showing one band, data not shown), and by the ability of the vesicles to form both an electric potential and a pH gradient. It was also tested that sonication of the plasma membranes for up to 15 min, did not produce any decrease of the ATPase activity. Although with rather short sonication times (from 3 to 5 min) it was possible to obtain a satisfactory preparation, but due to the variability of the procedure, it was decided to use 10 min for this sonication step as the usual procedure.

When vesicles were prepared, the ATPase activity varied also from 0.6 to $1.0 \mu\text{mol} \cdot (\text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1})$ (Tables I and II); it was always similar to the activity observed in the membrane preparation. The ATPase activity showed the same sensitivity to inhibitors as the plasma membrane preparations (Table I). This enzyme preparation was also relatively insensitive to DCCD and triphenyltin. One interesting fact, however, is that the ATPase activity of the vesicle preparation was stimulated by lysophosphatidylcholine (Table II), and this stimulation was not observed with the plasma membrane preparation. Besides, a small

TABLE II
EFFECTS OF LYSOPHOSPHATIDYLCHOLINE ON THE ATPase ACTIVITY OF PLASMA MEMBRANES AND VESICLES OF *S. cerevisiae*

The experiment was carried out as described under Methods. Lysophosphatidylcholine (lysoPC) was added at a concentration of 0.01 percent.

	Specific activity ($\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$)	Percent activity
Plasma membranes		
Control	836	100
LysoPC	844	101
Vesicles		
Control	796	100
LysoPC	929	117

but consid
FCCP an
cating al
ATPase
for the re
into lipos

Prelim
sulting fr
membran
that, whe
medium
potential,
was sensi
could be
of diprop
incubatio
into the
enzymes
outside o
isolated e
[9-11], th
in the ve
outside, i
into the v
positive i
this case,
membran
charged p
gradient w

Fig. 1
which sev
the vesicl
chloromet
The plas
liposomes
without sc
ing of the
this partic
cate for 2
generation
be interpre
to vanada
min, did n
of the fluc
tion time
besides, it
omes plu
lucent at
and 10 m

but consistent stimulation was observed also with FCCP and nigericin in the vesicles (Table I), indicating already some degree of coupling of the ATPase activity to proton pumping, as reported for the reconstituted preparations of the enzymes into liposomes [9-11,34].

Preliminary experiments with the vesicles resulting from the fusion of liposomes and plasma membranes, prepared in 100 mM KCl, showed that, when the vesicles were incubated in a K^+ -free medium and valinomycin was added, a diffusion potential, negative inside, was generated and it was sensitive to uncouplers (results not shown), as could be evidenced by the fluorescence quenching of dipropylthiacarbocyanine. ATP added to the incubation mixture was not expected to penetrate into the vesicles, but to be hydrolyzed by those enzymes with their active sites oriented toward the outside of the vesicles. If, as it happens with the isolated enzyme when reconstituted into liposomes [9-11], the ATPase were anisotropically inserted in the vesicles, by hydrolyzing ATP from the outside, it would be expected to pump protons into the vesicles, generating a membrane potential, positive inside, and a pH gradient, acid inside. In this case, it ought to be possible to monitor the membrane potential gradient with a negatively charged probe, like oxonol V [30,31], and the pH gradient with aminochloromethoxyacridine [10,23].

Fig. 1 shows the results of one experiment in which several sonication times were used to obtain the vesicles, following the quenching of aminochloromethoxyacridine upon addition of ATP. The plasma membranes, when mixed with the liposomes, and subsequently frozen and thawed, without sonication, did not produce any quenching of the fluorescence upon addition of ATP. In this particular experiment, it was enough to sonicate for 2 min to obtain maximal activity in the generation, by the addition of ATP, of what can be interpreted as a pH gradient, that was sensitive to vanadate. Further sonication times up to 15 min, did not produce any change in the quenching of the fluorescence. However, this minimal sonication time varied from one experiment to another; besides, it was found that the mixture of liposomes plus the plasma membranes became translucent at a sonication time that varied between 5 and 10 minutes. For this reason, and because of

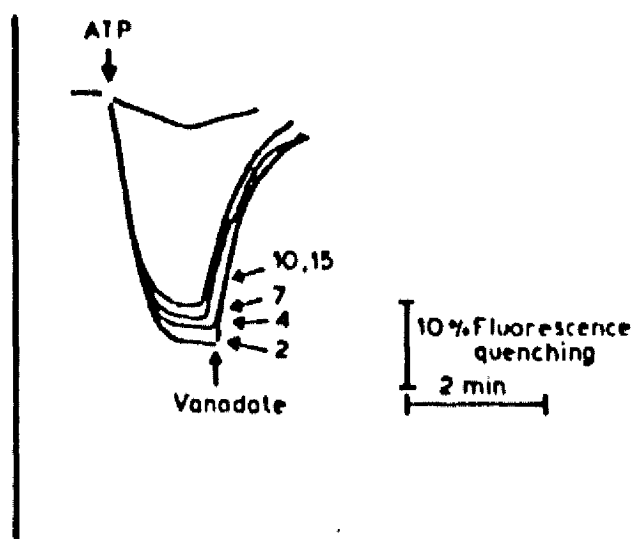


Fig. 1. Effect of the sonication time on the ability of the vesicles prepared to generate a pH gradient with ATP, as monitored with 1.5 μ M aminochloromethoxyacridine. The vesicles (400 μ g of protein in a final volume of 2.0 ml) were incubated in 20 mM sucrose, 1.5 mM $MgSO_4$, 10 mM Mes-triethanolamine buffer (pH 6.5) in the presence of 100 mM $NaNO_3$. The reaction was started by the addition of 1.5 mM ATP. The mixture of plasma membranes and liposomes was frozen and thawed twice, before sonication during the indicated times. Vanadate concentration was 100 μ M. The fluorescence was followed at 400-440 nm.

the difficulty to reproduce perfectly constant conditions, a sonication time of 10 min was chosen thereafter as the standard procedure for the preparation of the vesicles. The quenching of the fluorescence of aminochloromethoxyacridine upon the addition of ATP, on the other hand, indicated that protons, as expected, were pumped into the vesicles, generating a pH gradient, acid inside.

A membrane potential, positive inside, detected by the fluorescence changes of oxonol V was consistently observed; it was only slightly inhibited by oligomycin and completely by vanadate, diethylstilbestrol and triphenyltin. Besides, the quenching could be reversed by the uncoupler 1799, and partially by nigericin. These results agreed with the fluorescence changes of aminochloromethoxyacridine produced upon the addition of ATP, indicating the pumping of H^+ into the vesicles, and the generation of a membrane potential, positive inside (results not shown). Nigericin produced also a partial reversion of the quenching, probably by an uncoupling effect (not shown). All these results could be reproduced if the vesicles were prepared and incubated in either 10 mM KCl or 10 mM potassium acetate.

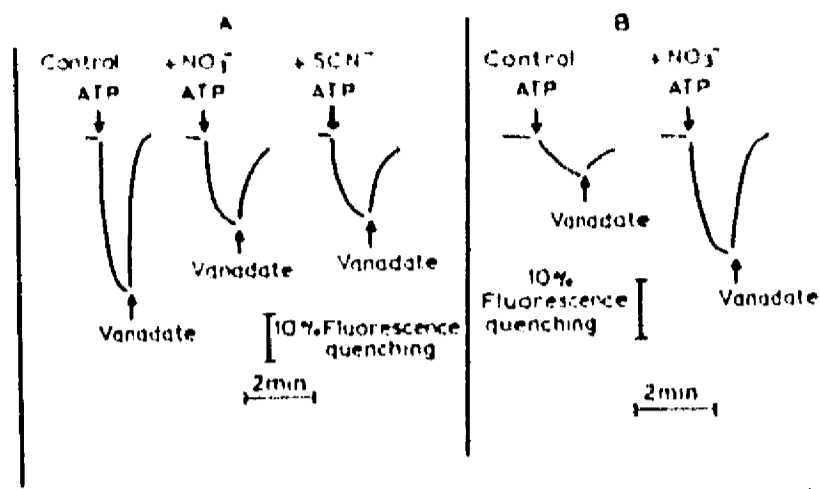


Fig. 2. (A) Effect of NO_3^- and SCN^- on the quenching of fluorescence of oxonol V (580–640 nm) after the addition of ATP to the plasma membrane vesicles of yeast. The vesicles were incubated as described under Methods, in the same medium used for Fig. 1, but with 5 mM MgSO_4 , and 2 μM oxonol V, and the reaction was started by the addition of 5 mM ATP. Where indicated, 100 mM of either NaNO_3 or NaSCN was included in the mixture. Vanadate concentration was 100 μM . (B) Effect of nitrate on the quenching of the fluorescence of aminochloromethoxyacridine by vesicles of plasma membrane from yeast upon the addition of ATP. The experiment was performed as described under Methods, in 20 mM sucrose, 10 mM Mes-triethanolamine (pH 6.5).

The addition of a permeant anion, like NO_3^- , or SCN^- , produced a decrease of the quenching values of oxonol V, as expected from the ability of these anions to move across membranes with their negative charge (Fig. 2A), neutralizing partially the membrane potential, positive inside. On the other hand, the quenching of aminochloromethoxyacridine that can be interpreted as the result of a pH gradient, was increased by these same anions, which, by relieving the membrane potential, allow the further pumping of protons and higher pH gradients (Fig. 2B). It can be observed that the pH gradient generated was also reversed by the uncoupler 1799. One of the inhibitors of this ATPase that has been reported is DCCD [2,7]. The experiment carried out to determine its action on the generation of an electrochemical potential gradient revealed that, even with large concentrations and with a preincubation of 20 min, no complete inhibition of the pH gradient generated could be achieved (not shown). This agreed partly with a relative insensitivity of the ATPase activity to this ionophore (see below).

Valinomycin, especially if compared to nitrate, produced only a small decrease of the quenching

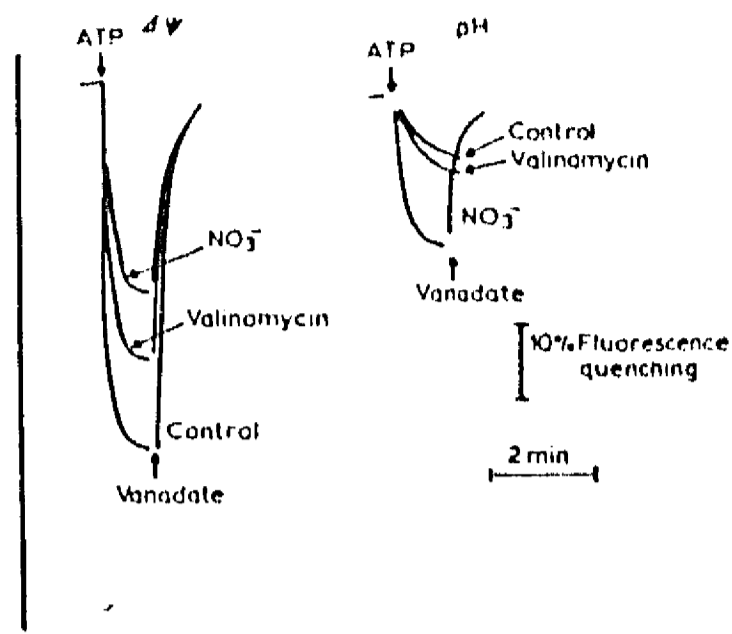


Fig. 3. Effects of valinomycin on the electric potential and pH gradient, as monitored by oxonol V and aminochloromethoxyacridine, respectively, in plasma membrane vesicles from yeast upon the addition of ATP. The experiment was carried out as in Fig. 2, but the vesicles were prepared and incubated in a medium in which 10 mM KCl was used instead of 20 mM sucrose. A tracing with nitrate is included for comparison.

of oxonol V even when the incubation was carried out by preparing and incubating the vesicles in 10 mM KCl (Fig. 3); similar results were obtained with vesicles prepared and incubated in potassium acetate (results not shown). These changes were expected to be at least as large as those observed with nitrate, but they were smaller than those produced by the permeant anion. This behavior of the antibiotic is consistent, however, with only a small stimulating effect (less than 10 percent) on the ATPase activity, observed when the vesicles were prepared in KCl and incubated in a K^+ -free medium (not shown).

The experiments to incorporate cytochrome oxidase into the vesicles proved to be successful; we were fortunate to find that the enzyme preparation used could be inserted in the membrane without the use of detergents, other than the Tween-20 used in the isolation procedure [28]. The experiments to define the characteristics of the insertion of cytochrome oxidase showed a reasonable degree of coupling of respiration. The respiratory ratio with/without 2 μM FCCP varied between 1.8 and 2.5, in comparison to what could be obtained with liposomes prepared from PC without the membranes, in which this ratio could reach a value close to 5.0 [28].

The addition of a substrate (ascorbate/tetramethyl-*p*-phenylenediamine/cytochrome *c*) to the inserted cytochrome oxidase could produce a membrane potential demonstrable by the distribution ratio of tetraphenylphosphonium between the vesicles and the medium (Table III), and the quenching of the fluorescence of dipropylthiocarbocyanine (Fig. 4). Moreover, as expected from the presence of a monovalent cation carrier from the plasma membrane, this potential could be partially reversed by K^+ and Rb^+ , but not by Na^+ or NH_4^+ . Both the quenching of fluorescence and the uptake of tetraphenylphosphonium were reversed by FCCP and CN^- (Table III, Fig. 4).

The transport of monovalent cations was studied in two different ways; the first one con-

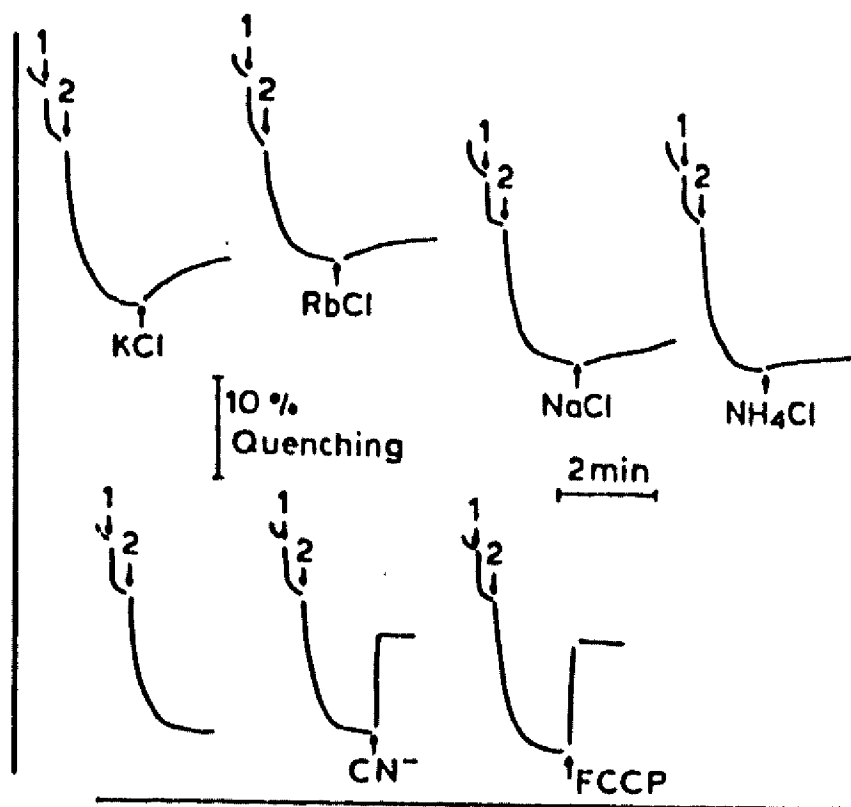


Fig. 4. Detection of a membrane potential in yeast plasma membrane vesicles with cytochrome oxidase incorporated; effects of monovalent cations. After sonication of the vesicles, 375 μ g of plasma membrane protein was added per ml, and the mixture was frozen in liquid nitrogen. After thawing at room temperature, the mixture was sonicated for 5 min. Then 25 μ l (170 μ g) of cytochrome oxidase in 50 mM potassium phosphate buffer (pH 7.0), 0.5% Tween 20 were added. The incubation mixture was: 50 mM phosphoric acid-triethanolamine (pH 7.0), 40 μ l (15 μ g of plasma membrane protein), in a final volume of 2.0 ml, room temperature. 0.5 μ M dipropylthiocarbocyanine was added, and then 200 μ g cytochrome *c* at (1), and the reaction was started by the addition of 3 mM ascorbate-triethanolamine (pH 7.0) and 0.3 mM tetramethyl-*p*-phenylenediamine at (2). At the indicated times either 5 mM monovalent cations, 1 μ M FCCP, or 200 μ M NaCN were added. Fluorescence was followed at 540–580 nm.

TABLE III

UPTAKE OF TETRAPHENYLPHOSPHONIUM BY PLASMA MEMBRANE VESICLES FROM YEAST WITH CYTOCHROME OXIDASE INCORPORATED

The vesicles were prepared and incubated as described for Fig. 4, during 5 min, in the presence of 2 μ M ³H-tetraphenylphosphonium and the indicated additions. 500 μ l was the final volume and 7.5 μ g of vesicle protein were used. After incubation, the amount of radioactive tetraphenylphosphonium remaining in the vesicles was measured as described under Methods.

Condition	nmol·mg ⁻¹
Complete system	10.9
No ascorbate	2.1
400 μ M NaCN	2.1
1 μ M FCCP	2.4
5 mM KCl	4.5
5 mM RbCl	6.9
5 mM NaCl	9.1
5 mM ammonium	11.3

sisted in measuring the efflux of K^+ from vesicles loaded with this cation, by means of a K^+ electrode. Fig. 5 shows that the vesicles were reasonably sealed; after a rapid initial increase of the K^+ concentration in the medium, due probably to the ion already out of the vesicles, a slow efflux was observed. The presence of ATP-Mg in the medium

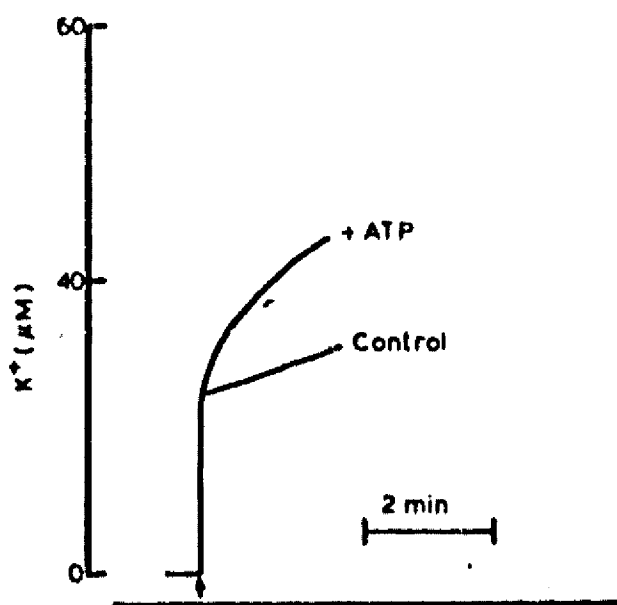


Fig. 5. Effect of ATP on the efflux of K^+ in yeast plasma membrane vesicles. Vesicles were prepared as described for Fig. 1, in 50 mM KCl, and passed through a column of 15 \times 0.7 cm of Sephadex G-50. Then, 200 μ g of membrane protein were added where indicated, to a final volume of 5.0 ml of 10 mM Mes-triethanolamine (pH 6.5), 100 mM sucrose, containing 1 mM ATP-Mg where indicated. The K^+ concentration changes were followed with a K^+ electrode (Orion).

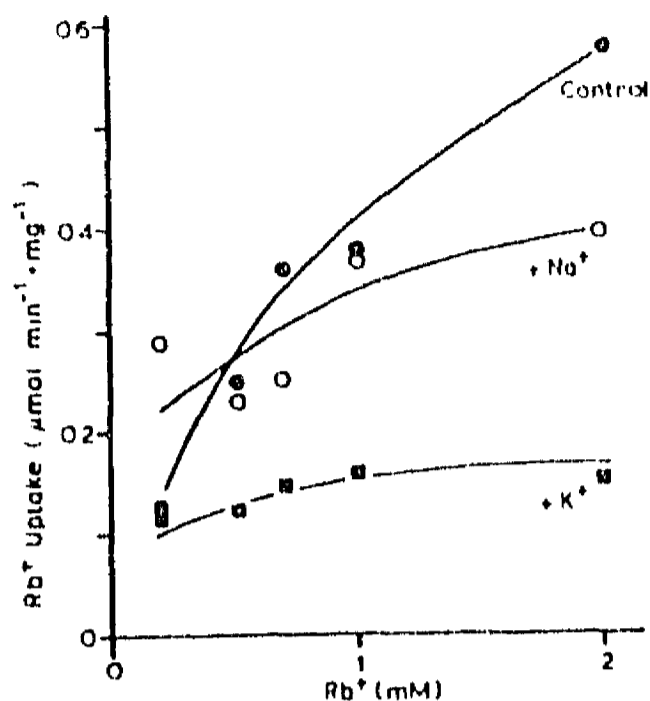


Fig. 6. Uptake of $^{86}\text{Rb}^+$ by yeast plasma membrane vesicles with cytochrome oxidase incorporated; Effects of K^+ and Na^+ . Vesicles were prepared and incubated as described for Fig. 4, but the indicated concentrations of RbCl were used, and $7.5 \mu\text{g}$ of vesicle protein ($20 \mu\text{l}$) were used in a final volume of $500 \mu\text{l}$. Incubation lasted for 10 min, at the end of which, the mixture was passed by centrifugation through a Sephadex G-50 column and the radioactivity remaining in the vesicles was counted as described under Methods. When present, the concentrations of sodium and potassium ions were 5 mM and 0.5 mM, respectively.

produced an increased efflux of the cation, probably because of the membrane potential, positive inside, generated by the membrane ATPase.

In another test, the vesicles to which cytochrome oxidase was incorporated, were assayed for their ability to take up $^{86}\text{Rb}^+$. The process could be energized by the addition of ascorbate, and inhibited by an uncoupler (not shown). Finally, it was also confirmed that the uptake process was saturable, as shown by the data of Fig. 6. This figure shows also that Rb^+ transport was inhibited by K^+ and to a lesser extent by Na^+ , as expected from the properties of the monovalent cation carrier in yeast [34].

Discussion

The preparation used in this work, showed properties similar to those described by Franzosoff and Cirillo [22], except for the fact that, in our hands, it showed activities of phosphatase and pyrophosphatase, that could be removed by an

additional centrifugation. The activity seemed to be due to the plasma membrane ATPase, since it was inhibited by vanadate and diethylstilbestrol contrary to the vacuolar enzyme, and not by oligomycin, which distinguished it from the mitochondrial activity [7,36,37]. The activity of the preparation was similar to that of other reported preparations [7,22,23].

Since the preliminary experiments, it was found that the vesicles could generate and maintain a diffusion potential, when loaded with KCl and in the presence of valinomycin (not shown). This fact, added to the sensitivity of the ATPase of the vesicles to FCCP, nigericin and lysophosphatidylcholine, suggested already that the vesicles were more or less sealed, and that the enzyme might be working as a proton pump in this preparation, to generate a membrane potential and a proton gradient.

Only a small activation of the ATPase activity was observed when the uncouplers and other ionophores were added; this could be due to a poor sealing of the membranes; however, this is probably not so, for several reasons: (a) the vesicles, when loaded with K^+ , could maintain for several minutes a diffusion potential; (b) the efflux of K^+ shown in Fig. 5 was slow; (c) a potential gradient could be generated both by ATPase and cytochrome oxidase, and (d) ion transport could be demonstrated (Figs. 5 and 6). Also small stimulations by ionophores and uncouplers were reported for this ATPase when reconstituted into liposomes [11]. It is possible that the low stimulation produced by uncouplers was due to an inadequate insertion of the ATPase in the vesicles, or also to ion transport systems present in the preparation (of which at least monovalent cation transport could be demonstrated).

Experiments, performed to define the characteristics of the electrochemical potential difference generated by ATP between the inside and the outside of the vesicles, confirm that the electrochemical potential difference consists of an electric component, positive inside, as well as a pH gradient, acid inside the vesicles. Besides, the addition of permeant anions was found to decrease the positive potential generated by ATP, and this coincided with an increase of the pH gradient. These results indicated that the ATPase

was at least partially coupled and capable of generating a membrane potential.

The membrane preparation appears to have some advantages over that reported by Fuhrmann et al. [21], as well as that of Peters and Borst-Pauwels [38]. Those preparations were tried and found to have a low ATPase activity (not shown), and it was not possible to generate a membrane potential in them, most probably because they were leaky. Another vesicle preparation from the plasma membrane of *Saccharomyces cerevisiae* has been reported by Ahlers [23], and it seems also adequate to be used in solute transport studies.

The possibility to incorporate cytochrome oxidase into the vesicles made more interesting this membrane preparation, especially because the procedure was found to be extremely simple; in fact, it was only necessary to mix the enzyme with the vesicles to get a reasonable degree of incorporation of the functional enzyme, that was also capable of generating a membrane potential, negative inside, which could be verified both by the fluorescence quenching of dipropylthiacarbocyanine and the distribution of tetraphenylphosphonium. This is a very convenient way to develop a membrane potential that has the same polarity observed in the whole cell [7,20], and might be used to drive ions inside, as postulated for yeast [1,7,16].

The study of ion movements seems to confirm that the carrier for monovalent alkali cations is present in these vesicles. This was indicated by the following facts: (a) the increased efflux of K^+ produced in the vesicles by the addition of ATP; (b) the uptake of Rb^+ , apparently driven into the vesicles by the membrane potential generated by cytochrome oxidase, (c) the saturability of this system by Rb^+ ; (d) the possibility to inhibit this transport more or less selectively by K^+ , and to a much lower degree by Na^+ , and (e) the fact that K^+ and Rb^+ , but not Na^+ , were able to produce a decrease of the membrane potential, as seen both by the quenching of fluorescence of the cyanine, and by the decrease of the uptake of tetraphenylphosphonium by the vesicles with cytochrome oxidase incorporated. However, the value of kinetic constants is difficult to determine from our experiments. Several factors may influence the results, such as the presence of other carriers, and the

orientation of the yeast membrane fragments in the vesicles, which most probably is produced at random during the fusion process.

The preparation with the incorporated cytochrome oxidase can also be interesting, because it shows that monovalent cations (Rb^+) can be taken up in the absence of ATP, just by generating a membrane potential. As in intact cells, transport of monovalent cations appeared to be driven by a membrane potential; the transport was selective and seemed more or less saturable. Besides, as shown in the vesicles with cytochrome oxidase incorporated, it might not necessarily be coupled to the hydrolysis of ATP in an exchange for H^+ [39].

In summary, the results obtained in this work are an indication that this preparation may be used as an adequate model to start the study of ion transport in vesicles of plasma membrane of yeast, that seem to preserve the components of at least some of the solute transport systems present in the cell.

Acknowledgements

This work was partially supported by grants ICCBXNA-01877 and PCEXCNA-040298, from the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología of México. We also acknowledge Professor Vincet Cirillo for his kind suggestions and for reading the manuscript.

References

- 1 Goffeau, A. and Slayman, C.W. (1981) *Biochim. Biophys. Acta* 639, 197-323
- 2 Delhez, J., Dufour, J.P., Thines, D. and Goffeau, A. (1977) *Eur. J. Biochem.* 79, 319-328
- 3 Dufour, J.P. and Goffeau, A. (1978) *J. Biol. Chem.* 253, 7026-7032
- 4 Dufour, J.P., Boutry, M. and Goffeau, A. (1980) *J. Biol. Chem.* 255, 5735-5745
- 5 Willsky, G.R. (1979) *J. Biol. Chem.* 254, 3326-3332
- 6 Addison, R. and Scarborough, G. (1981) *J. Biol. Chem.* 256, 13164-13171
- 7 Serrano, R. (1985) *Plasma Membrane ATPase of Plants and Fungi*, CRC Press, Boca Raton, FL
- 8 Serrano, R., Miellandt-Brandt, M.C. and Fink, G.R. (1986) *Nature* 319, 689
- 9 Dufour, J.P. and Tsong, T.Y. (1982) *Biophys. J.* 37, 96-97
- 10 Dufour, J.P., Goffeau, A. and Tsong, T.Y. (1982) *J. Biol. Chem.* 257, 9365-9371

- 11 Malpartida, F. and Serrano, R. (1981) *J. Biol. Chem.* 256, 4175-4177
- 12 Villalobo, A., Boutry, M. and Goffeau, A. (1981) *J. Biol. Chem.* 256, 12081-12087
- 13 Scarborough, G.A. (1976) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 73, 1485-1488
- 14 Scarborough, G.A. (1980) *Biochemistry* 19, 2925-2931
- 15 Borbolla, M. and Peña, A. (1980) *J. Membrane Biol.* 54, 149-156
- 16 Peña, A. (1975) *Arch. Biochem. Biophys.* 167, 397-409
- 17 Peña, A. (1978) *J. Membrane Biol.* 42, 199-213
- 18 Seaton, A., Inkson, C. and Eddy, A.A. (1973) *Biochem. J.* 134, 1031-1043
- 19 Van den Broek, P.J.A. and van Steveninck, J. (1982) *Biochim. Biophys. Acta* 693, 213-220
- 20 Perlin, D.S., Kasano, K., Brooker, R.J. and Slayman, C.W. (1984) *J. Biol. Chem.* 259, 7884-7892
- 21 Fuhrmann, G.F., Boehm, C. and Theuvenet, A.P.R. (1976) *Biochim. Biophys. Acta* 433, 583-596
- 22 Franzusoff, A.J. and Cirillo, V.P. (1983) *J. Biol. Chem.* 258, 3608-3614
- 23 Ahlers, J. (1984) *Can. J. Biochem. Cell Biol.* 62, 998-1005
- 24 Matsushita, K., Patel, L., Gennis, R.B. and Kaback, H.R. (1983) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80, 4889-4893
- 25 Driessen, A.J.M., De Vrij, W. and Konings, W.N. (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82, 7555-7559
- 26 Hirata, H., Sone, N., Yoshida, N. and Kagawa, Y. (1977) *J. Supramol. Struct.* 6, 77-84
- 27 De Kloet, S.R., Van Wermeskerken, R.K.A. and Konigsberger, V.V. (1961) *Biochim. Biophys. Acta* 47, 138-146
- 28 Ramirez, J., Calahorra, M. and Peña, A. (1987) *Anal. Biochem.*, in the press
- 29 Fiske, C.A. and SubbaRow, Y. (1925) *J. Biol. Chem.* 177, 751-766
- 30 Smith, J.C., Russ, P., Cooperman, B.S. and Chance, B. (1976) *Biochemistry* 15, 5094-5105
- 31 Smith, J.C., Frank, S.J., Bashford, C.L., Chance, B. and Rudkin, B. (1980) *J. Membrane Biol.* 54, 127-139
- 32 Peña, A., Uribe, S., Pardo, J.P. and Borbolla, M. (1984) *Arch. Biochem. Biophys.* 231, 217-225
- 33 Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J. (1951) *J. Biol. Chem.* 193, 265-275
- 34 Serrano, R. (1980) *Eur. J. Biochem.* 105, 419-424
- 35 Armstrong, W.Mc D and Rothstein, A. (1964) *J. Gen. Physiol.* 48, 61-71
- 36 Bowman, E.J. (1983) *J. Biol. Chem.* 258, 15238-15244
- 37 Kakinuma, Y., Ohsumi, Y. and Anraku, Y. (1981) *J. Biol. Chem.* 256, 10859-10863
- 38 Peters, P.H.S. and Borst-Pauwels, G.W.F.H. (1979) *Physiol. Plant.* 46, 330-337
- 39 Villalobo, A. (1982) *J. Biol. Chem.* 257, 1824-1828

Patch-clamp re-
isolated periton-
pipette configur-
range. The chan-
full channel cur-
of three well-de-
on zymosan. U-
conductance of
Anion channels
the membrane.
solutions. Ther-
stimulus respon-

Introduction

The role of e-
as changes of t-
induced phago-
some controve-
served that rat-
tained hyperpe-
cytosis of late
phages, ingesti-

Abbreviation: He-
sulphonic acid.

Correspondence: I-
culty of Biology, I-

0005-2736/87/\$01

Leucine transport in plasma membrane vesicles of *Saccharomyces cerevisiae*

M. Calahorra, M. Opekarová*, J. Ramirez and A. Peña

Department of Microbiology, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado 70-600.04510, Mexico City, Mexico and *Department of General Microbiology, Institute of Microbiology, Czechoslovak Academy of Sciences, Videnská 1083 142 20, Prague 4, Czechoslovakia

Received 13 February 1989

Yeast plasma membrane vesicles were obtained by the fusion of liposomes with purified yeast membranes by means of the freeze thaw-sonication technique. Beef heart mitochondria cytochrome-*c* oxidase was incorporated into the vesicles. Addition of substrate (ascorbate/TMPD/cytochrome *c*) generated a membrane potential negative inside, and an alkaline pH gradient inside the vesicle, that served as the driving force for leucine transport. Both ΔpH and $\Delta\psi$ could drive leucine transport. When ΔpH was increased in the presence of valinomycin and potassium, at the expense of $\Delta\psi$, leucine uptake increased by 10%.

Amino acid transport; Leucine transport; Electrochemical potential; Proteoliposome; Membrane vesicle; (Yeast)

1. INTRODUCTION

It is generally accepted that the transport of amino acids into yeast is driven by protonmotive force. Most of the evidence for this hypothesis comes from studies with intact cells (for review see [1]). Studies with whole cells, however, are often complicated by cellular metabolism and/or the difficulties encountered during the estimation of the components of the protonmotive force in the cells. The interference of metabolism and cell compartmentation can be overcome by employing plasma membrane vesicles. Since Kaback developed a procedure for the isolation of closed bacterial cytoplasmic membrane vesicles, this approach has

been widely used in studies of solute transport in bacteria (for review see [2]). Reasonably sealed plasma membrane vesicles from *Saccharomyces cerevisiae* were prepared only recently using the technique of fusion of membranes with liposomes. Transport studies performed in such a system demonstrated a specific transport of D-glucose [3,4], transient protonmotive-force-driven leucine uptake [5] and membrane potential-driven ion transport [6]. To obtain more information on the role of protonmotive force on the transport of amino acids in yeast, a system is necessary which would generate and maintain for a reasonable long time period a membrane electrochemical potential difference of the same polarity as in whole cells. Such a system has been developed by Matsushita et al. [7] and by Driessen et al. [8,9], who demonstrated an accumulation of sugar and a large number of amino acids in bacterial membrane vesicles that have been fused with cytochrome-*c* oxidase proteoliposomes. The protonmotive force was generated by cytochrome oxidase with ascorbate/TMPD/cytochrome *c* as the electron donating system. In this study we

Correspondence address: M. Calahorra, Department of Microbiology, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado 70-600.04510, Mexico City, Mexico

Abbreviations: CCCP, carbonylcyanide-*m*-chlorophenylhydrazine; DiSC₃(3), dipropylthiacarbocyanine; PC, phosphatidylcholine; PS, phosphatidylserine; TEA, triethanolamine; TMPD, *N,N,N',N'*-tetramethyl-*p*-phenylenediamine

demonstrate that a similar system can be used in amino acid transport studies in yeast.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Yeast and its cultivation

Saccharomyces cerevisiae DC XII was grown for 20 h at 30°C in a yeast semisynthetic medium [10] in which NH_4^+ was replaced by proline (2 mg/ml). After harvesting, the cells were washed twice with distilled water and kept overnight at 4°C.

2.2. Preparation of protoplasts

Protoplasts were prepared essentially according to Kováč et al. [11]. After 1 h incubation with snail gut enzyme or 40 min with lyticase (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO), 95–98% of the cells were converted to protoplasts. They were washed twice with 50 mM Tris-HCl, pH 7.4, containing 0.9 M sorbitol, 10 mM MgSO_4 , and preincubated for 1 h in the same medium with 0.8% glucose at 30°C.

2.3. Preparation of plasma membrane

Plasma membranes were prepared from the protoplasts by the concanavalin A method used by Opekarová et al. [5].

2.4. Liposome preparation

A mixture of acetone washed phosphatidylcholine (Sigma) ($60 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$) and phosphatidylserine, 1 mg/ml (Avanti Chem), in 50 mM $\text{H}_3\text{PO}_4/\text{TEA}$, pH 7, was sonicated to clarity using a probe sonifier (Branson Sonic B-12).

2.5. Purification of cytochrome-c oxidase

Cytochrome-c oxidase was purified from beef heart mitochondria using the method described by Ramírez et al. [12].

2.6. Fusion of plasma membranes with liposomes and cytochrome oxidase incorporation

Cytochrome-c oxidase was incorporated into the liposomes as previously described by Ramírez et al. [12]. The resulting proteoliposomes (0.8 ml) were mixed with 0.5 ml yeast plasma membranes (1.8 mg protein). The mixture was rapidly frozen in liquid nitrogen and then thawed slowly at room temperature. The turbid mixture was briefly sonicated at 4°C.

2.7. Determination of $\Delta\psi$ and ΔpH

The membrane potential (interior negative) was determined by the fluorescence quenching of dipropylthiacarbocyanine ($\text{DiSC}_3(3)$) as described by Calahorra et al. [6]. The pH gradient was determined by the fluorescence changes of 8-hydroxy-1,3,6-pyrenetrisulfonate (pyranine). Liposomes in which 2 mM of dye was enclosed [13] were fused with plasma membranes as described above and the hybrid vesicles were passed through a Sephadex G 25 column to remove the external fluorescent probe. 10 μl of the vesicles were added to a cuvette with 2 ml final volume of 50 mM $\text{H}_3\text{PO}_4/\text{TEA}$, pH 7.0, with or without 2.5 μM valinomycin and 5 mM KCl. The ΔpH formation was started by the addition of 1 mM ascorbate/TEA, pH 7.0, 0.1 mM TMPD and 150 μg cytochrome c. Fluorescence was measured at 467–510 nm.

2.8. Transport assay

The vesicles were diluted with 2.0 ml of 50 mM $\text{H}_3\text{PO}_4/\text{TEA}$, pH 7.0, 5 mM MgSO_4 to a final concentration of 0.8 mg protein per ml. At zero time, 50 μM [^3H]leucine (spec. act. 0.2 Ci/mmol; 7.4×10^6 Bq/mol), was added. 1 min later, 50 mM ascorbate/TEA, pH 7.0, 1 mM TMPD and 290 μg cytochrome c were added. Aliquots of 100 μl were withdrawn at intervals and diluted with 2.0 ml of ice-cold 100 mM LiCl. The suspension was filtered through 0.30 μm cellulose nitrate filters (Millipore) and washed once with 2.0 ml of LiCl. Filters were dried and transferred to scintillation vials with 5 ml of a scintillation cocktail and measured with a Packard liquid scintillation counter.

2.9. Protein determination

Protein was assayed according to Lowry et al. [14], using bovine serum albumin as standard.

3. RESULTS AND DISCUSSION

Cytochrome-c oxidase incorporated into plasma membrane vesicles proved to be a powerful tool for generating a protonmotive force (alkaline and negative inside), which was able to drive the transport of a number of amino acids in bacterial vesicles [15]. Until now, however, only one report appeared on cytochrome oxidase functionally incorporated into yeast plasma membrane vesicles. Using a simple and efficient method for reconstitution [12], Calahorra et al. [6] demonstrated $^{86}\text{Rb}^+$ uptake into yeast plasma membrane vesicles with this respiratory enzyme incorporated. In this work we used the same method for reconstructing a system in which transport of amino acids in yeast can be studied.

We found that, as compared with vesicles containing only phosphatidylcholine (data not shown), cytochrome-c oxidase embedded liposomes prepared from the mixture of phosphatidylcholine and phosphatidylserine in a ratio 60:1 form more tightly sealed vesicles after fusion with the yeast membranes. This was demonstrated by higher values of respiratory control [12] and membrane potential formed in these vesicles.

On addition of the electron donating system to the suspension of yeast plasma membrane vesicles with cytochrome oxidase, a considerable membrane potential was formed, as demonstrated by the fluorescence quenching of the cyanine $\text{DiSC}_3(3)$ (fig. 1A). This membrane potential could be abolished by CCCP. Considerably lower fluorescence quenching was observed (negligible $\Delta\psi$ formation) in the presence of valinomycin and

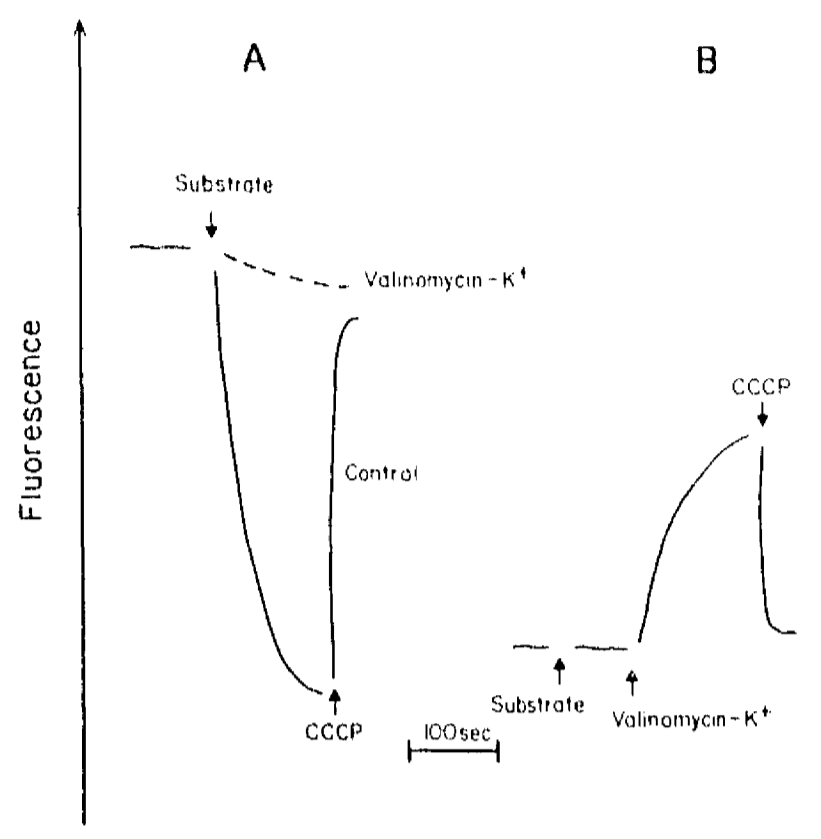


Fig.1. (A) Detection of a membrane potential in yeast plasma membrane vesicles with cytochrome oxidase incorporated. Effect of K^+ and valinomycin. Vesicles ($50 \mu\text{g}$ protein) were added to $50 \text{ mM H}_3\text{PO}_4/\text{TEA}$, pH 7.0, and 0.5 M cyanine in a final volume of 2 ml . The reaction was started by the addition of substrate (1 mM ascorbate/TEA, pH 7, 0.1 mM TMPD, $150 \mu\text{g}$ cytochrome *c*) when indicated by the arrow; and collapsed with $2.5 \mu\text{M}$ CCCP. Where indicated, the experiment was performed in the presence of 5 mM KCl and 2.5 M valinomycin. (B) Detection of a pH gradient. Vesicles ($50 \mu\text{g}$ protein) loaded with 2.0 mM pyranine were added in a cuvette with 2.0 ml final volume $50 \text{ mM H}_3\text{PO}_4/\text{TEA}$, pH 7.0. The reaction was started by the addition of substrate as in A. The addition of 5 mM KCl and $2.5 \mu\text{M}$ valinomycin generated an alkaline pH gradient inside that collapsed with $2 \mu\text{M}$ CCCP as indicated by the arrow.

potassium ions. The generation of the other component of the protonmotive force (ΔpH), monitored by pyranine (fig.1B), showed no pH gradient formation, unless valinomycin and potassium were present. This pH gradient, again, could be abolished by CCCP.

In our vesicle preparation, it is thus possible to create two sets of conditions for energizing amino acid transport, one with the protonmotive force consisting predominantly of $\Delta\psi$ in the absence of valinomycin and potassium, and another with it consisting essentially of the pH gradient, in the presence of the ionophore and K^+ .

The leucine transport energized by the protonmotive force generated by cytochrome-*c* oxidase

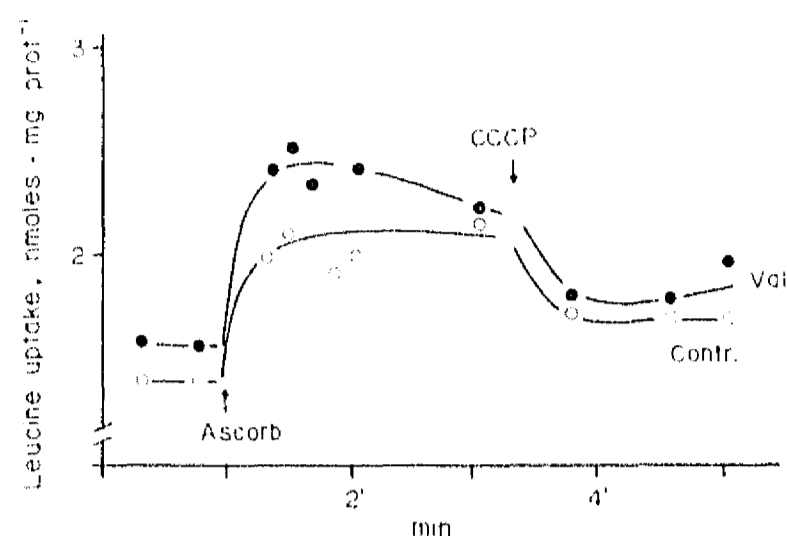


Fig.2. Leucine uptake by yeast plasma membrane vesicles with cytochrome-*c* oxidase incorporated. Vesicles were prepared as described in section 2 and added in the following medium: 5 mM MgSO_4 , 50 M [^3H]leucine, $50 \text{ mM H}_3\text{PO}_4/\text{TEA}$, pH 7.0, in the presence (●) or absence (○) of 50 mM KCl and $2.5 \mu\text{M}$ valinomycin. The substrate (50 mM ascorbate/TEA, pH 7.0, 0.5 mM TMPD and $290 \mu\text{g}$ cytochrome *c*) was added as indicated. $6 \mu\text{M}$ CCCP was added as indicated.

was assayed under both sets of conditions. On addition of a suitable electron donor system, a rapid leucine accumulation was observed (fig.2). In the presence of K^+ and valinomycin (ΔpH conditions), uptake was approximately 10% higher than in their absence ($\Delta\psi$ conditions). No leucine uptake occurred in the presence of CCCP. Further, addition of the uncoupler to the vesicles in which leucine had already accumulated caused its efflux.

Protonmotive force formed on plasma membrane is the driving force for amino acid uptake in yeast, as shown for whole cells (review [1]), and demonstrated in yeast plasma membrane vesicles energized with valinomycin mediated diffusion potential [5]. The system we report in this work confirms these findings, and similarly, as in bacteria [15], opens the possibility of studying the role of particular components of the protonmotive force in energization of transport processes in yeast.

REFERENCES

- [1] Horák, J. (1986) *Biochim. Biophys. Acta* 864, 223-256.
- [2] Kaback, H.R. (1982) *Curr. Top. Membr. Transp.* 16, 393-404.
- [3] Franzusoff, A.J. and Cirillo, V.P. (1983) *J. Biol. Chem.* 258, 3608-3614.
- [4] Ongjoco, R., Szkutnicka, K. and Cirillo, V.P. (1987) *J. Bacteriol.* 169, 2926-2931.

- [5] Opekarová, M., Driessen, A.J.M. and Konings, W.N. (1987) FEBS Lett. 213, 45-48.
- [6] Calahorra, M., Ramirez, J., Clemente, S.M. and Peña, A. (1987) Biochim. Biophys. Acta 899, 229-238.
- [7] Matsushita, K., Pattel, L., Gennis, R.B. and Kaback, H.R. (1983) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82, 7555-7559.
- [8] Driessen, A.J.M., De Vrij, W. and Konings, W.N. (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82, 7555-7559.
- [9] Driessen, A., De Vrij, W. and Konings, W.N. (1986) Eur. J. Biochem. 154, 617-624.
- [10] Sigler, K., Knotková, A. and Kotyk, A. (1981) Biochim. Biophys. Acta 643, 572-582.
- [11] Kováč, L., Bednarová, H. and Greksák, K.M. (1968) Biochim. Biophys. Acta 153, 32-42.
- [12] Ramirez, J., Calahorra, M. and Peña, A. (1987) Anal. Biochem. 163, 100-106.
- [13] Bell, D.H., Paterson, L.K. and Gould, M. (1983) Biochim. Biophys. Acta 725, 368-375.
- [14] Lowry, O., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J. (1978) Anal. Biol. 87, 206.
- [15] Driessen, A.J.M., Hellingwerf, K.J. and Konings, W.N. (1987) Microbiol. Sci. 4, 173-180.

AMINO ACID UPTAKE INTO YEAST PLASMA MEMBRANE VESICLES DRIVEN BY INCORPORATED CYTOCHROME C OXIDASE

MIROSLAVA OPEKAROVÁ¹, MARTHA CALAHORRA, JORGE RAMÍREZ, ANTONIO PEÑA

¹Institute of Microbiology, Czechoslovak Academy of Sciences, Viděnská 1083, 142 20 Prague (Czechoslovakia); Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, 0451 México, D.F.

INTRODUCTION

Study of transport energization has advanced considerably with the use of vesicles prepared from bacterial plasma membrane. In yeast such a system appears to be even more appealing since inner membranes and the resulting compartmentation complicate energization studies in intact cells. We report on an attempt to construct sealed plasma membrane vesicles from *Saccharomyces cerevisiae* with incorporated bovine heart mitochondria cytochrome oxidase. On addition of an electron donor a considerable membrane potential ($\Delta\psi$) is formed in the vesicles accompanied by an enhanced uptake of leucine.

MATERIALS AND METHODS

Plasma membranes from *Saccharomyces cerevisiae* DC XII were prepared as in ref. 1. Liposomes were prepared by sonication of phosphatidylcholine (PC) (50 mg/ml) in 50 mM H_3PO_4 /TEA, pH 7.0. The debris was removed by centrifugation at 30 °C (20 min, 38 000 g). Cytochrome oxidase isolated according to ref. 2, was fused with resonicated liposomes (0.2 mg/ml) at 4 °C. The resulting proteoliposomes were mixed with yeast plasma membranes (1.8 - 4.8 mg protein/50 mg PC), frozen, thawed and sonicated (1). $\Delta\psi$ was determined from distribution of tetraphenylphosphonium (TPP^+) across the membrane using a TPP^+ - selective electrode. For transport assay the membrane vesicles were diluted to a final concentration of 1 - 4 mg protein/ml into 50 mM H_3PO_4 /TEA, pH 7.0, 10 mM MgSO_4 and electron donor (25 mM ascorbate, 2.5 mM tetramethylphenylenediamine, 2.8 mg cytochrome c/ml). After 30 sec ¹⁴C-labeled amino acids (38 μM) were added. Samples were taken and measured as in ref. 3.

RESULTS AND DISCUSSION

The assumption that amino acid transport into yeast cells is driven by protonmotive force (pmf) on the plasma membrane can best be confirmed by using yeast plasma membrane vesicles on which the transport energization

Manuscript del Congreso Workshop on Plant Transport
Veracruz, México Julio 1989

can be clearly defined. Cytochrome oxidase incorporated into bacterial membrane vesicles generates a large pmf which drives the uptake of several amino acids (3). We constructed a similar system using yeast plasma membranes. On addition of electron donor to the vesicles a sizable $\Delta\psi$ is formed. The decrease of TPP⁺ concentration after 5 min corresponds to $\Delta\psi$ of 83 mV. The uptake of two amino acids (leucine, glutamate) was tested in the system (Fig. 1). Assuming that under non-energized conditions external and internal leucine equilibrates a specific internal volume of 2.7 $\mu\text{l}/\text{mg}$ protein was estimated. Generation of $\Delta\psi$ caused about 40 % increase in leucine uptake. By contrast, glutamate equilibrated only to an internal volume of 1.4 $\mu\text{l}/\text{mg}$ and energization caused its extrusion, probably due to its negative charge. In bacterial vesicles Driessen et al. (3) demonstrated after energization a manifold increase in leucine accumulation. Whatever the conditions used, in our system we achieved only 10 - 40 % increase of leucine uptake in response to a considerable $\Delta\psi$. This might be due to an incomplete fusion of membranes with proteoliposomes or due to the fact that pmf on the plasmalemma may not be the only driving force necessary for amino acid uptake. Both possibilities are under study.

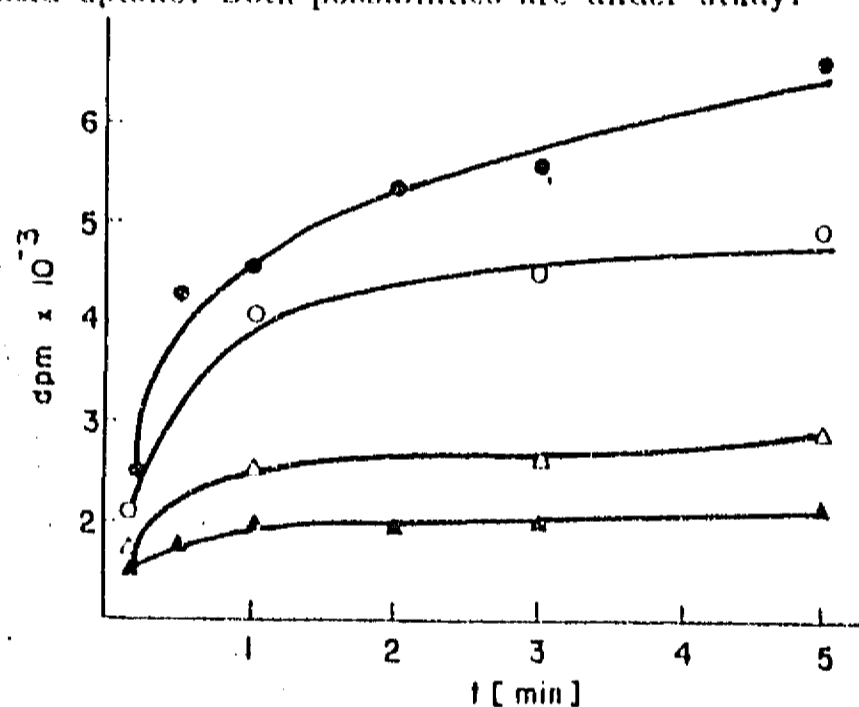


Fig. 1. Leucine (●,○) and glutamate (▲, △) uptake into the vesicles under energized (●, ▲) and non-energized (○, △) conditions.

REFERENCE

1. Opekarová M, Driessen AJM, Konings WN (1987) FEBS Letters 213, 45-48
2. Ramírez J, Calahorra M, Peña A (1987) Anal Biochem 163, 100-106
3. Driessen AJM, de Vrij W, Konings WN (1986) Eur J Biochem 154, 617-624