

00562  
2  
19

Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Química

GENERACION DE  $\Delta\Psi$ ,  $\Delta\text{pH}$  Y TRANSPORTE DE  $\text{K}^+$  Y  
 $\text{Ca}^{++}$  EN VESICULAS DE MEMBRANA PLASMATICA DE  
Saccharomyces cerevisiae

TESIS

Para obtener el título de :

MAESTRO EN CIENCIAS QUIMICAS ( BIOQUIMICA )

Presenta :

Martha Calahorra Fuertes

México, D.F., 1986.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



## **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.

#### ABREVIATURAS

ACMA	9 amino 6 cloro metoxiacridina
MES	Ácido 2(n-morfolino) etanosulfónico
CCCP	carbonilcianida m-clorofenilhidrazona
1799	aductor 2:1 de hexafluoroacetona y acetona
DCCD	diciclohexilcarbodiimida
DEB	dietilestilbestrol
TPT	trifenilestaño
EDTA	ácido etilendiamino tetracético
TEA	trietanolamina
DISC <sub>3</sub> (3)	3,3 dipropilcarbocianina
PNPP	paranitrofenilfosfato
FCCP	carbonilcianida trifluorometoxifenilhidrazona
PMSF	fenilmetilsulfonilfluoruro

## RESUMEN

Se obtuvo una preparación de vesículas de membrana plasmática de S.cerevisiae de acuerdo al método reportado por Franzusoff y Cirillo (J.Biol.Chem. 258: 3608, 1983) con algunas modificaciones.

Esta preparación fue capaz de generar un potencial de membrana, por actividad de la ATPasa, al adicionar Mg-ATP al medio; medido por cambios de fluorescencia con el colorante Oxonol V. Este potencial fue sensible a inhibidores específicos de la ATPasa plasmática y a desacoplantes. De igual manera se genera un gradiente de pH, el cual fue medido por cambios en la fluorescencia del ACMA.

Con estas vesículas se midió la salida de  $K^+$ , con un electrodo selectivo, provocado por la actividad de la ATPasa al añadir Mg-ATP al medio y la entrada de  $^{45}Ca^{++}$  al generar un potencial artificial con valinomicina en vesículas cargadas con  $K^+$ .

Los resultados obtenidos indican que estas vesículas se encuentran selladas, siendo capaces de generar un potencial de membrana, positivo en el interior, y un gradiente de pH, ácido en el interior, y son adecuadas para ser utilizadas en el estudio del transporte de iones en la membrana plasmática de la levadura.

## SUMMARY

A preparation of vesicles from yeast plasma membrane was obtained, according to Franzusoff and Cirillo (J.Biol.Chem. 258: 3608, 1983), with slight modifications.

When Mg-ATP was added, this preparation was able to generate a membrane potential, as measured by the fluorescence changes of the dye oxonol V, that was sensitive to inhibitors of the  $H^+$ -ATPase of yeast and uncouplers.

A transport of  $K^+$  was measured in this vesicles, using a specific  $K^+$  electrode, produced by the activity of the ATPase when Mg-ATP was added to the preparation, also the entrance of  $^{45}Ca^{++}$ , when an artificial potential was generated with valinomycin in vesicles charged with  $K^+$ .

The results obtained indicate that this vesicles are well sealed and capable of measuring a membrane potential, positive inside, and a pH gradient, acid inside, which may wonder them suitable to be used in studies of ion transport in yeast.

## CONTENIDO

### INTRODUCCION

- Características generales de la ATPasa de  $H^+$  de la membrana plasmática. -5-
- Purificación y reconstitución de la enzima en membranas. -6-
- Vesículas de membrana. -9-

### MATERIAL Y METODOLOGIA

- 1) Cultivo de las células. -13-
- 2) Purificación de la membrana plasmática. -14-
- 3) Determinación de proteínas. -16-
- 4) Formación de las vesículas de membrana plasmática. -16-
- 5) Ensayo enzimático. -16-
- 6) Pruebas fluorescentes. -17-
- 7) Microscopía electrónica. -18-
- 8) Medida del transporte de potasio. -18-
- 9) Medida del transporte de calcio. -19-

### RESULTADOS

- Purificación de la membrana. -20-
- Actividad de ATPasa de la membrana. -20-
- Formación de las vesículas. -22-
- Microscopía electrónica. -22-
- Detección de un potencial de difusión. -24-

- Actividad de ATPasa de las vesículas.	-24-
- <u>Generación</u> de un potencial de membrana.	-29-
- Formación de un gradiente de pH.	-32-
- Efecto del DCCD y la valinomicina sobre la formación del potencial y el gradiente de pH.	-35-
- Transporte de potasio.	-39-
- Transporte de calcio.	-39-

## DISCUSION

1) Caracterización de la membrana plasmática purificada.	-42-
2) Formación de vesículas selladas.	-42-
3) Actividad de ATPasa.	-43-
4) Formación de un potencial de difusión.	-44-
5) Potencial de membrana y gradiente de pH.	-44-
6) Transporte de potasio y calcio.	-46-

BIBLIOGRAFIA	-49-
--------------	------

## INTRODUCCION

Las levaduras son organismos unicelulares, eucariontes, que han sido clasificados dentro del Reino Fungi y se encuentran representados en la Naturaleza por aproximadamente 39 géneros y 350 especies. La mayoría de ellas se encuentran asociadas al progreso, tanto industrial como comercial de la humanidad, debido a su capacidad de convertir azúcar, rápida y eficientemente, en etanol y  $\text{CO}_2$  por medio del proceso de fermentación alcohólica.

Desde tiempo inmemorial, las levaduras han sido utilizadas para la producción de vinos, cerveza y pan, habiéndose encontrado en excavaciones de Tebas, urnas de cerveza con levadura sedimentada, que datan de 2000 años A.C.

Otra contribución muy importante de las levaduras al progreso de la humanidad, ha sido en la investigación científica; se dice que la bioquímica nació con la tecnología de la levadura; a partir de ellas se han elucidado muchos procesos bioquímicos y metabólicos que se llevan a cabo en los organismos en general. Se puede decir que estos estudios bioquímicos se iniciaron cuando los hermanos Buchner en 1897 descubrieron la fermentación del azúcar a partir de "jugos" de levadura que utilizaban para curar ciertas enfermedades (1).

Luis Pasteur fue uno de los primeros investigadores que se preguntó por qué las levaduras acidificaban el medio externo en el que se encontraban, y no fue hasta 1943 cuando Conway confirmó que durante la fermentación de la glucosa, había una producción masiva de  $\text{H}^+$  de la célula que acidificaba rápidamente el medio; proponiendo la existencia, en la membrana plasmática de la levadura, de un catalizador redox (probablemente un citocromo) que sacara  $\text{H}^+$  al medio y que pasara los electrones a algún aceptor orgánico en la célula (fig.1 A).

Siguiendo las investigaciones, observaron que los flujos de protones iban

acompañados de la entrada de  $K^+$  a la célula; se propuso entonces la existencia de un acarreador electroneutro capaz de intercambiar  $K^+$  extracelular por  $H^+$  intracelular (fig 1 B), pero este modelo no explicaba cómo se acoplaba la energía a estos movimientos de iones (2).

Posteriormente, cuando se empezaron a realizar estudios electrofisiológicos en células de gran diámetro, en donde es posible introducir microelectrodos, se postuló la existencia de bombas electrogénicas de  $H^+$  en las membranas plasmáticas de hongos, plantas y algas (fig.1 C), debido a que los potenciales de membrana medidos con los microelectrodos no podían ser explicados en términos de potenciales de una difusión pasiva de iones.

El potencial de la membrana plasmática está dado por una distribución desigual de iones en ambos lados de ésta que origina un desbalance eléctrico por los movimientos compensatorios de los iones a través de la membrana. Cuando existe un desbalance eléctrico, los iones permeantes se mueven a través de la membrana en respuesta al potencial hasta que se establece un equilibrio electroquímico. Este movimiento de iones permeantes es el llamado potencial de difusión y está dado por la ecuación de Nernst para cuando se trata de un solo ión permeante :

$$E = \frac{RT}{zF} \ln \frac{\text{ion dentro}}{\text{ion fuera}}$$

R = cte. gral de los gases, T = temperatura absoluta, F = cte. de Faraday, z = valencia del ión permeante

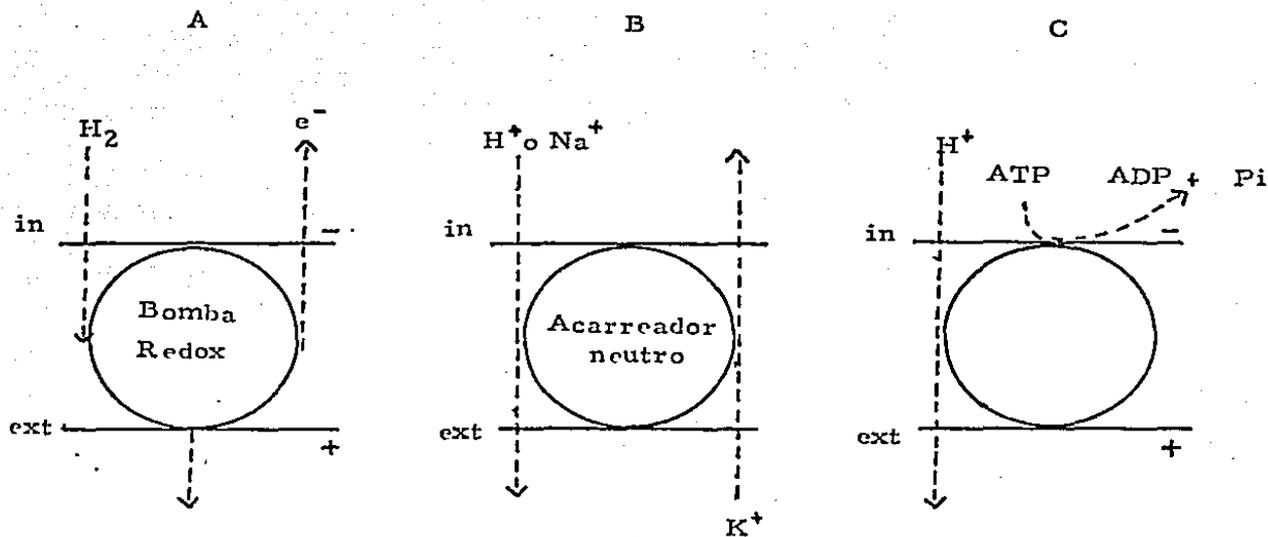


Fig 1.- A) Hipótesis redox de Conway. B) Intercambio electroneutro de  $K^+ / H^+ \circ Na^+$ . C) Bomba electrogénica de  $H^+$  ( tomado de (2) ).

Sin embargo, en las membranas biológicas existe mas de un ión permeante y entonces el potencial de difusión esta dado por la ecuación de Goldman :

$$E = \frac{RT}{F} \ln \frac{P_{Na}(Na)_f + P_K(K)_f + P_{Cl}(Cl)_d}{P_{Na}(Na)_d + P_K(K)_d + P_{Cl}(Cl)_f}$$

$P_{Na}$  = permeabilidad del Na,  $P_K$  = permeabilidad del K,  $P_{Cl}$  = permeabilidad del Cl

Por lo tanto la capacidad de mantener un cierto potencial de membrana estaria dada por el transporte activo de todos los iones, para el cual se requiere energia. Debido a esto, en los hongos se postuló la existencia de la bomba, que seria la generadora de energia, apoyándose en los datos de que los inhibidores metabólicos eran capaces de disminuir el potencial de membrana e inhibir los flujos iónicos. En las levaduras se sugirió (3) que esta bomba de protones podria ser una ATPasa que al hidrolizar el ATP soltaba un protón al medio, produciendo un desequilibrio de cargas y explicando así el acoplamiento energético. Por otro lado se observó que en estos organismos el transporte activo de nutrientes se lleva a cabo por cotransporte con  $H^+$ , lo cual sugirió la existencia de un mecanismo quimiosmótico donde el gradiente electroquímico de protones generado por la bomba, proporcionaría la energia para la entrada de nutrientes a la célula. El papel de este gradiente fue postulado por primera vez por Eddy e Indge en 1962 (9) y hasta ahora se ha pensado que es el responsable del transporte de metabolitos tales como  $Ca^{++}$ ,  $K^+$ , aminoácidos, fosfato y azúcares (3,4,5,6,7,8).

Actualmente ya ha sido purificada y caracterizada una ATPasa de protones de la membrana plasmática. Esta bomba seria fisiológicamente equivalente a la

ATPasa  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  de la membrana plasmática de las células animales (10).

### Características generales de la $\text{H}^+$ -ATPasa de la membrana plasmática.

En la mayoría de las levaduras estudiadas y en ciertos hongos como Neurospora crassa las características generales de la ATPasa de  $\text{H}^+$  de membrana plasmática son similares y se diferencian de la ATPasa mitocondrial o vacuolar de estos mismos organismos.

Por electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS de la enzima purificada, se ha encontrado que está constituida por un solo polipéptido de 100,000 a 105,000 daltones, a diferencia de la mitocondrial que está formada por varias subunidades. Su pH óptimo varía dependiendo de la levadura; para Schizosaccharomyces pombe se ha reportado de 6 (11), Candida tropicalis entre 6 y 6.7 (12), Neurospora crassa de 6.8 (13) y Saccharomyces cerevisiae de 7.5 (14,15,16) y 5.5 (17). Aunque los valores de pH óptimo reportados en la literatura varían de 5.5 a 7.5, parece ser que estas variaciones pueden explicarse por diferencias en las condiciones experimentales (2) ya que se han reportado diferentes valores para el pH óptimo que varían dentro de ese rango en una misma cepa; otra posibilidad sería que existiera contaminación con ATPasa mitocondrial en esas preparaciones cuyo pH óptimo en todos los casos se encuentra alrededor de 9, o de ATPasa vacuolar para la cual es de 7.5 (18,19).

El sustrato específico de la enzima es el ATP -  $\text{Mg}^{++}$ ; en la ATPasa purificada se ha visto que el  $\text{Co}^{++}$  y el  $\text{Mn}^{++}$  también pueden funcionar como cofactores (2). A bajas concentraciones de  $\text{Mg}^{++}$  libre que van de 0.02 a 1 mM la enzima se activa, mientras que a concentraciones más altas, hasta 10 mM se observa una inhibición pseudocompetitiva (14,20); otros autores reportan que 5 mM es la concentración óptima y hasta 25 mM observan solo un 20 % de inhibición (17).

La relación óptima  $Mg^{++}$  - ATP parece ser de 1 aunque Delhez et.al. (11) reportan que es de 1.5.

Los cationes monovalentes son capaces de activarla (12,21,22), aunque por estudios preliminares en nuestro laboratorio parece deberse a un efecto de la fuerza iónica y no de los cationes "per se". La ATPasa mitocondrial también es estimulada (2) pero no así la ATPasa vacuolar (23); además se ha reportado que los cationes monovalentes también son capaces de protegerla contra la inactivación (14).

Los cationes divalentes en cambio, tienen un efecto inhibitor en presencia de  $Mg^{++}$  (12,22), a diferencia de la ATPasa vacuolar la cual no se inhibe con  $Ca^{++}$  como en el caso de la plasmática.

Otra propiedad de la ATPasa de la membrana plasmática, es su especificidad por ciertos inhibidores que no afectan a las otras dos; tal es el caso del vanadato y el DEB; la enzima no es inhibida por oligomicina, venturicidina ni azida, que son específicos de la mitocondrial y por lo tanto, tampoco afectan a la vacuolar (24,25). Por otra parte existe una serie de inhibidores que afecta a ambas enzimas con diferente especificidad como son el DCCD, Dio 9, NaF, etc.

(3,11,12,14,17,18,19,21,23,26,27). La inhibición por vanadato de la ATPasa de membrana plasmática, a diferencia de las otras ATPasas, sugiere la existencia de un intermediario fosforilado en el mecanismo enzimático, al igual que en la ATPasa de  $Na^{+}/K^{+}$  y la de  $Ca^{++}$ , ya que el vanadato se ha postulado como un análogo del Pi en los estados de transición durante la hidrólisis del fosfato en proteínas (17,28).

#### Purificación y reconstitución de la enzima en membranas.

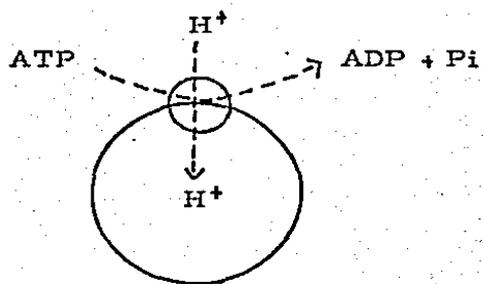
Se han utilizado diferentes técnicas para la purificación de esta enzima;

dado que se trata de una proteína integral de membrana es necesaria la utilización de detergentes para lograr su solubilización; aunque los métodos difieren en pequeños detalles como el uso de diferentes detergentes, etc., básicamente consisten en los mismos pasos (27,29,30). Con la ATPasa purificada se realizó una serie de estudios de caracterización y comprobación de lo que se había observado en las investigaciones con el organismo completo. Al utilizar las técnicas que se han desarrollado para la reconstitución de proteínas en membranas artificiales (31,32), se logró incorporar la ATPasa purificada a liposomas y se comprobaron definitivamente las observaciones de que en efecto se trata de una bomba electrogénica de  $H^+$  (33,34,35).

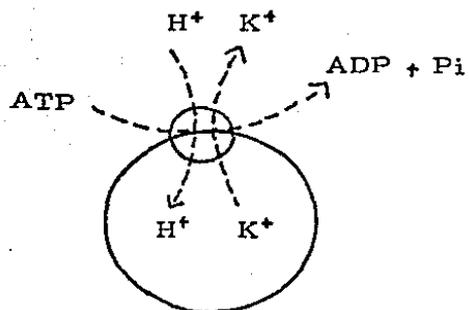
En los estudios realizados por Malpartida y Serrano (10) con la ATPasa purificada de S.cerevisiae y reconstituida en liposomas, se obtuvieron resultados con los cuales proponen que la ATPasa, al menos en su sistema, se comporta de manera heterogénea; parte de las moléculas operan como bomba electrogénica de protones y parte como bomba electroneutra, transportando también  $K^+$  en un intercambio  $H^+/K^+$ . Estos autores además postulan una tercera posibilidad de que la ATPasa realice un intercambio electrogénico de  $2H^+/K^+$  (fig.2). También indicaron que en su preparación de ATPasa "purificada" tienen polipéptidos de bajo peso molecular, lo que parece sugerir que tal vez alguno de ellos pueda actuar como acarreador de  $K^+$  que también se les incorpora en los liposomas y ser el causante de la heterogeneidad que observan.

Otro autor que apoya este punto de vista de que la ATPasa de protones en realidad es una ATPasa  $H^+/K^+$  es Villalobo A. (36,37), que propone que la enzima se encuentra involucrada en la translocación de los iones  $K^+$  a través de la membrana plasmática vía una compuerta sensible a voltaje que puede estar localizada en la misma enzima (36).

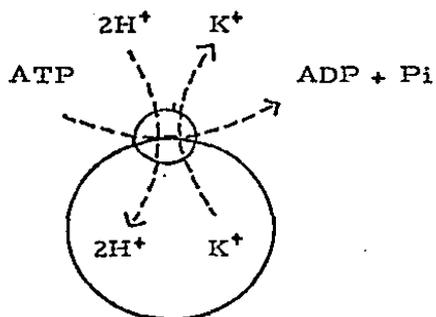
Aunque la ATPasa pudiera funcionar como una bomba de cationes por la cual el



A



B



C

Fig 2.- A) Bomba electrogênica de  $H^+$  . B) Intercambio electroneutro  $H^+ / K^+$  . C) Intercambio electrogênico  $H^+ / K^+$  . (tomado de (3)).

$K^+$  sería translocado al interior celular y los  $H^+$  al exterior a expensas de la hidrólisis de ATP, las posibilidades son que el transporte de  $K^+$  se lleve a cabo impulsado por la fuerza electromotriz de  $H^+$  en lugar del potencial de membrana como se había propuesto ya que los potenciales de membrana calculados para las levaduras (ver pag.10) son muy bajos para poder explicar la distribución de  $K^+$  observada en las células (38).

Trabajando con las células completas es difícil interpretar esto, ya que para medir los flujos de protones se usan electrodos de pH o métodos espectrofotométricos (39) que detectan la acidificación neta, la cual además de los  $H^+$  puede estar dada por ácidos orgánicos que también son expulsados por la célula (40); además como se ha observado que con algunos inhibidores hay salida de  $K^+$  (41,42); es necesario decidir qué flujos de cationes se encuentran directamente acoplados a la hidrólisis de ATP y cuales indirectamente.

Estas dificultades pueden disminuirse si se trabaja con vesículas de membrana plasmática en las cuales se elimina por completo el metabolismo celular y es posible controlar las composiciones iónicas de las soluciones tanto internas como externas.

#### Vesículas de Membrana

La utilidad de usar 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 hongos, solamente en el caso de Neurospora crassa cuya membrana se vesicula fácilmente se habían podido realizar estos estudios (43,44,45). En el caso de las levaduras especialmente Saccharomyces cerevisiae había sido difícil obtener preparaciones de vesículas selladas; las preparaciones que se habían logrado (46) tenían baja actividad de

ATPasa y no se encontraban selladas. Hace poco tiempo Franzusoff y Cirillo (47) modificando el procedimiento de Fuhman et.al.(46) obtuvieron vesículas de Saccaromyces cerevisiae con las cuales estudiaron el transporte de glucosa. Recientemente Ahlers (22) reportó una preparación de vesículas capaces de generar un gradiente de pH.

Una manera de comprobar que las vesículas se encuentran selladas es determinando si son capaces de generar y mantener un potencial de membrana. En células de gran tamaño este potencial puede medirse directamente con electrodos colocados a ambos lados de la membrana y midiendo la diferencia de potencial existente, pero en las vesículas o en las células pequeñas es necesario utilizar métodos indirectos, como determinar la distribución al equilibrio de iones en el interior y en el exterior y de ahí calcular el potencial, como se ha hecho con la distribución de cationes lipofílicos como el tetrafenilfosfonio ( $\text{TPP}^+$ ) y el trimetilfenilfosfonio ( $\text{TPMP}^+$ ), los cuales se equilibran de acuerdo al potencial y por su permeabilidad pasiva a través de la membrana, estudiando su distribución en condiciones en las cuales la célula se encuentra despolarizada o hiperpolarizada. Los potenciales de membrana medidos en células de levadura por esta técnica varían entre -50 y -120 mV, dependiendo de la especie estudiada y del pH externo al cual se mida. Para S.cerevisiae se han reportado a pH 7 valores de -76 mV (48), -120 mV (49), -90 mV (50).

También se han utilizado los colorantes fluorescentes para la detección y medición del potencial de membrana. Existen tres clases principales que han demostrado ser eficientes para estos fines que son las merocianinas, cianinas y oxonoles (51,52) (fig.3). En general son moléculas cargadas, permeables a través de la membrana y que se redistribuyen pasivamente dependiendo de los cambios de potencial y mostrando cambios de absorción o fluorescencia hasta de un 90%. Usando una cianina se midió el potencial de membrana de S.cerevisiae, y se obtuvo

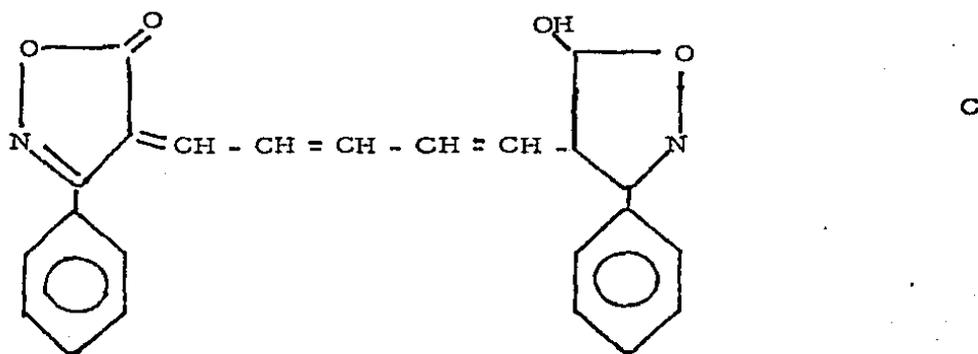
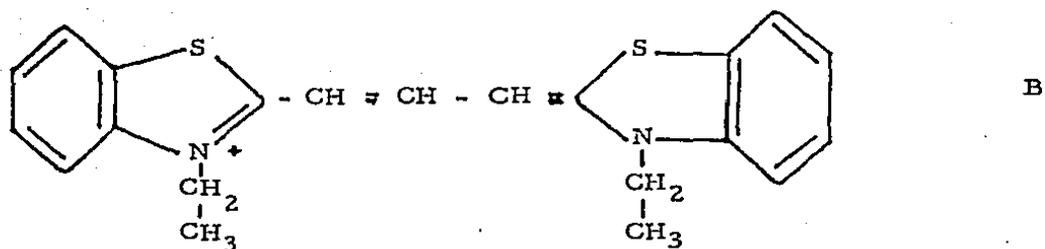
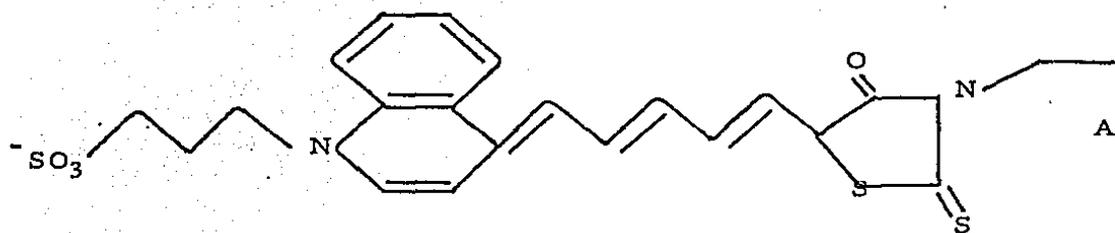


Fig 3.- A) Merocianina WW 375. B) Cianina DiSC<sub>3</sub>(3). C) Oxonol V.

un valor de -74 mV a pH 6 (53), valor que está en el rango de los calculados por los otros métodos, por lo que si parecen ser confiables para hacer determinaciones cualitativas del potencial.

Otra manera de saber que las vesículas se encuentran selladas es ver si son capaces de mantener el gradiente de pH generado por la actividad de la ATPasa. Esto también ha sido medido, en diversos sistemas, con colorantes fluorescentes que detectan cambios de pH, como la fluoresceína (54,55,56,57) la 9-amino acridina (58,59) el naranja de acridina (45) y la 9-amino 6-cloro 2 metoxiacridina (ACMA) (22,34,35).

Con toda la información de que se dispone hasta el momento aún quedan muchas preguntas por responder para lograr esclarecer de que manera se encuentran acoplados los flujos de iones a la actividad de la ATPasa. Debido a esto el objetivo de este trabajo fue tratar de lograr una preparación de vesículas de membrana plasmática de S.cerevisiae que se encontraran selladas, si lográbamos sellarlas entonces serían capaces de generar un potencial de membrana y un gradiente de pH por actividad de la ATPasa al agregar Mg-ATP. También era importante que éstas vesículas tuvieran una buena actividad de ATPasa, así como todos los componentes de la membrana plasmática para poder realizar estudios de transporte de metabolitos, ya que el interés principal del laboratorio es el estudio del transporte de diversos metabolitos en las células de levadura y con éstas vesículas se abriría un gran campo para facilitar dichos estudios.

## MATERIAL

El oxonol V y el DiSC<sub>3</sub>(3) fueron obtenidos de Molecular Probes, Junction City, Oregon.

El ACMA fue donado por el Dr. P. Overath, Max Planck Institute for Biology, Tubingen.

El 1799 fue donado por el Dr. P.G. Heytler, Dupont de Nemours, Wilmington, Delaware, USA.

El mercaptoetanol se obtuvo de Schwarz/Mann Dickinson and Co. Orangeburg, New York.

El imidazol, MgSO<sub>4</sub>, KCl, TCA fueron de Baker y Co. México.

Todos los demás reactivos fueron de Sigma Chemical Co. St. Louis Mo. USA, u obtenidos comercialmente de grado analítico.

## METODOLOGIA

### 1) Cultivo de las células.

La levadura Saccharomyces cerevisiae se obtuvo comercialmente de La Azteca S.A. El paquete de células se resuspendieron a razón de 30 gm/lt (peso húmedo) en el medio descrito por De Kloet et.al. (60) que contiene CaCl<sub>2</sub> 0.382 gr/lt, MgSO<sub>4</sub> 0.513 gr/lt, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2 gr/lt, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 6 gr/lt, bactopectona 5 gr/lt, extracto de levadura 2.5 gr/lt, glucosa anhidra 40 gr/lt y lactato de sodio al 50% 7.12 ml; incubándose durante 8 h a 30°C bajo aeración vigorosa. Posteriormente,

las células se centrifugaron a 3000 rpm durante 5 min. y se lavaron dos veces con agua desionizada, resuspendiéndolas finalmente en 400 ml de agua. Se aerearon durante toda la noche (15 - 18 hs) burbujeando aire a través de la suspensión. A la mañana siguiente, las células se centrifugaron y se lavaron una vez con agua desionizada.

## 2) Purificación de la membrana plasmática.

Se purificaron de acuerdo con Franzusoff y Cirillo (47). La técnica consiste en lavar una vez las células en un amortiguador que contiene sacarosa 0.25 M, imidazol 10 mM, EDTA 1 mM, mercaptoetanol 2 mM, PMSF 1 mM, y  $\text{NaN}_3$  al 0.02% pH 7.4 (amortiguador A). Se resuspendieron las células en este mismo amortiguador (150 gm de peso húmedo en 250 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  $\text{CO}_2$ , durante 90 seg en lotes de 50 ml, colocando la mitad de perlas en el frasco y lo demás con las células resuspendidas. Una vez rotas todas las células, la suspensión final se filtró en un embudo de vidrio de filtración de 40-60 cms para eliminar las perlas de vidrio, las cuales se lavaron con 100 ml del mismo amortiguador A frío.

El homogeneizado anterior se sometió a centrifugaciones diferenciales, alternados con sonicaciones en un sonicador de vastago MSE, a 2 amperes, cambios de pH, congelación en un baño de hielo seco acetona y descongelación en un baño de agua a temperatura ambiente como se indica en la fig.4. A partir del precipitado 4, la resuspensión de las muestras se realizó en el amortiguador B que contenía Tris 10 mM, EDTA 1 mM, PMSF 0.1 mM,  $\text{NaN}_3$  al 0.02% y mercaptoetanol 2 mM pH 7.5.

A esta técnica se le adicionó en el último paso una centrifugación a 36 000 rpm x 40 min de las membranas resuspendidas en el amortiguador B. Las membranas

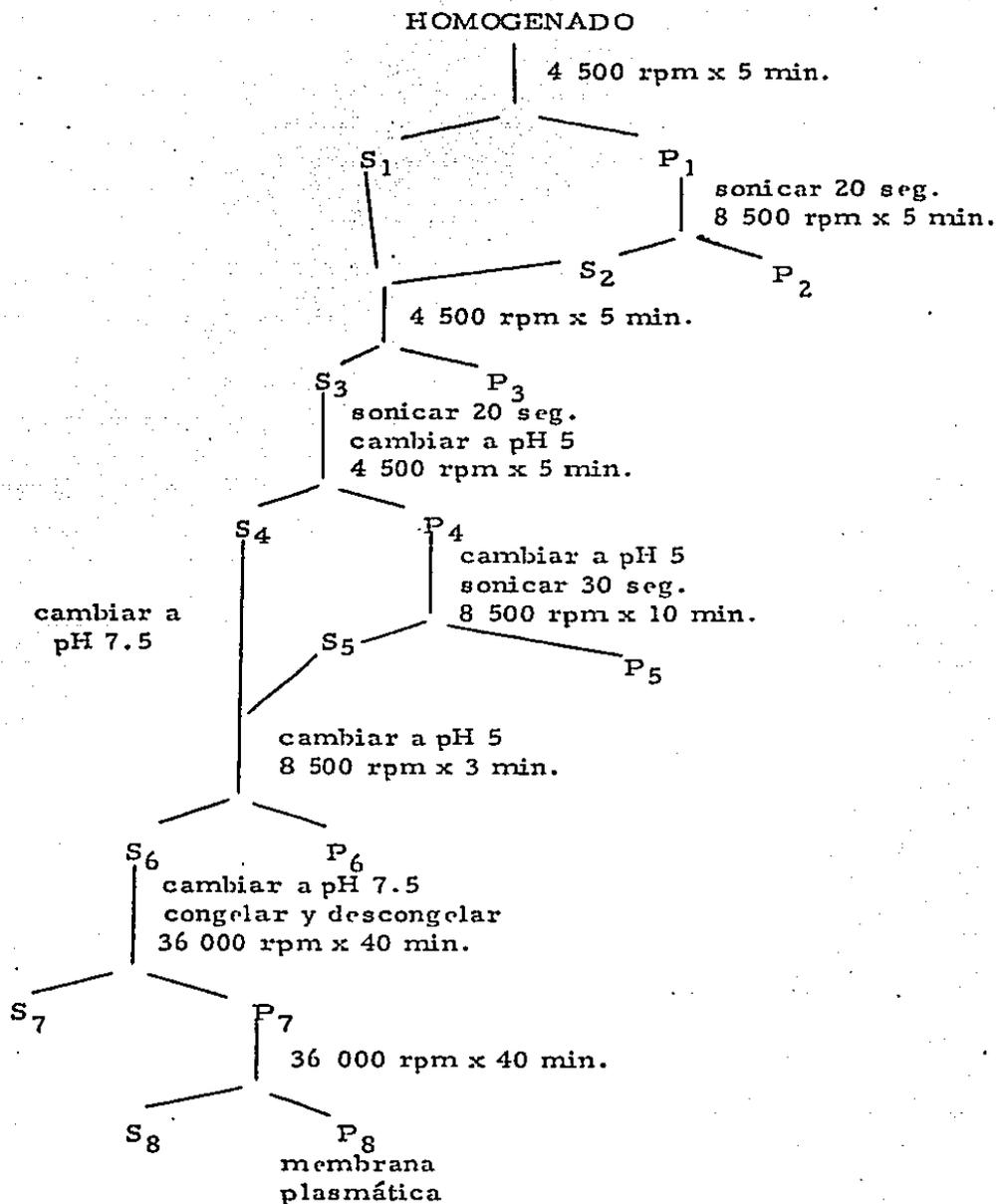


Fig 4.- Esquema de la purificación de la membrana plasmática.

se resuspendieron finalmente en un volumen mínimo del mismo amortiguador a razón de 10 - 20 mg de proteína/ml. El lavado adicional se llevó a cabo para eliminar las actividades de pirofosfatasa y fosfatasa encontradas en la muestra. La pureza de la preparación se estudió por microscopía electrónica y por la actividad de ATPasa sensible a vanadato, oligomicina y azida de sodio.

### 3) Determinación de proteínas.

La proteína se determinó mediante la técnica de Lowry (61) utilizando albúmina de suero bovino como estándar.

### 4) Formación de las vesículas de membrana plasmática.

Se siguieron los procedimientos de Franzusoff y Cirillo (47) con algunas modificaciones. Se prepararon liposomas de fosfatidilcolina de soya (Sigma Chemical Company P-3644) a una concentración de 47.6 mg/ml, en un amortiguador MES-TEA 10 mM pH 6.5, EDTA 1 mM, que contenía además acetato de K 10 mM, o sacarosa 20 mM, o KCl 10 mM, sonicándose a claridad, generalmente durante 45 seg., en un sonicador de bastago (Branson Sonic Power Company, Modelo B 12). De la suspensión de liposomas se tomó 31.5 mg de éstos y se mezcló con 4 mg de proteína de membrana plasmática, llevándolas a un volumen final de 1 ml con el mismo amortiguador. Se agitaron suavemente, se congelaron en un baño de hielo seco-acetona y se descongelaron a temperatura ambiente dos veces. Posteriormente se sonicaron en un baño sonicador (Branson B 32) con 0.01 % de tritón, durante tiempos variables hasta que la mezcla se aclarara, generalmente este tiempo fue de 10 min.

### 5) Ensayo enzimático.

La determinación de actividad de la ATPasa en la preparación de membrana

plasmática y en las vesículas se midió en un volumen final de 350  $\mu$ l de un medio de reacción que contenía sacarosa 20 mM, MES-TEA 10 mM pH 6.5, EDTA 1 mM,  $MgSO_4$  10 mM y ATP 6 mM. La reacción se comenzó por la adición del ATP y la mezcla se incubó a 30 C durante 10 min. La incubación se detuvo adicionando 100  $\mu$ l de TCA al 30 % y transfiriendo los tubos a un baño de hielo. Posteriormente se centrifugaron 3 min a 3000 rpm y en una alícuota de 200  $\mu$ l del sobrenadante se midió el contenido de fosfato por el método de Fiske y Subbarow (62), preparando un estándar de fosfatos para cada ensayo. La actividad se va a expresar como  $\mu$ mol de fosfato (min x mg prot)<sup>-1</sup>

Para medir si había actividad de ATPasa mitocondrial en la muestra de membrana plasmática se ensayó de la misma manera mencionada anteriormente pero utilizando como amortiguador Tris  $SO_4$  100 mM pH 9.

La concentración de proteína utilizada en cada ensayo fue de 100  $\mu$ g. Los inhibidores utilizados se preincubaron 2 min con la preparación excepto para el DCCD, que se preincubó 20 min a las concentraciones mencionadas en las tablas respectivas.

#### 6) Pruebas fluorescentes.

El potencial de difusión generado con valinomicina, se detectó por el apagamiento de la fluorescencia del DiSC<sub>3</sub>(3) excitando a 540 nm y recogiendo la emisión a 590 nm (53). Las vesículas se prepararon en un amortiguador MES-TEA 10 mM, KCl 100 mM pH 6.5. 100  $\mu$ l de vesículas se adicionaron a un volumen final de 2 ml en una celdilla que contenía MES-TEA 10 mM pH 6.5, sacarosa 200 mM y DiSC<sub>3</sub>(3) 4  $\mu$ M. Las adiciones fueron valinomicina 1.5 ng, CCCP 1  $\mu$ M, KCl 5 mM y 1799 10  $\mu$ M.

La formación de un potencial de membrana y un gradiente de pH se ensayaron

por el apagamiento de la fluorescencia con Oxonol V (63,64) y ACMA (22,34,35), respectivamente. El Oxonol V se excitó a 580 nm y se midió la fluorescencia emitida a 650 nm. Para el ACMA las longitudes de onda utilizadas fueron 400-470 nm.

Las vesículas preparadas en los diferentes amortiguadores (400 ug de proteína) se adicionaron en una celdilla con MES-TEA 10 mM pH 6.5 y sacarosa 20 mM, KCl 10 mM o acetato de potasio 10 mM, en un volumen final de 2 ml. Para estudiar el potencial de membrana generado por hidrólisis de ATP se utilizó  $MgSO_4$  5 mM, Oxonol V 8  $\mu$ M y se inició la reacción adicionando ATP 5 mM. Para la medida del gradiente de pH se utilizó  $MgSO_4$  1.5 mM, ACMA 6  $\mu$ M, y se inició la reacción con ATP 1.5 mM. En ambos casos se hizo un trazo agregando 10 ug de oligomicina para determinar el grado de contaminación mitocondrial de cada preparación. Las medidas de fluorescencia se llevaron a cabo en un fluorómetro de SLM Instruments Inc.

#### 7) Microscopía electrónica.

Las muestras de membrana purificada y de las vesículas se sometieron a una tinción negativa, poniendo una gota de la suspensión respectiva sobre la rejilla, secándola con un papel filtro y aplicando una gota de ácido fosfotúngstico al 0.2 %. Se dejó teñir durante un minuto y se secó con un papel filtro. Las preparaciones fueron observadas y fotografiadas en un microscopio electrónico de transmisión Jeol 100 B.

#### 8) Medida del transporte de $K^+$ .

Se prepararon vesículas de la misma manera indicada anteriormente en un amortiguador MES-TEA 10 mM pH 6.5, KCl 50 mM, EDTA 1 mM. Se pasaron por una columna de Sephadex G 50 fino de 0.7 x 25 cm equilibrada con MES-TEA 10 mM pH 6.5, sacarosa 100 mM eluyéndolas con el mismo amortiguador.

Los movimientos de  $K^+$  de las vesículas cargadas fueron monitoreados con un electrodo selectivo de  $K^+$  Orion, usando un electrodo de referencia de calomel, en una cámara de 10 ml a 25°C.

Los electrodos se conectaron a un amplificador potenciométrico Heath-Schlumberger modelo EU 200-1 conectado a un graficador. Los trazos se iniciaron al adicionar 50 ul de las vesículas en un medio que contenía MES-TEA 10 mM pH 6.5, sacarosa 100 mM, KCl 20 uM y con o sin Mg-ATP 1 mM. Los controles respectivos se llevaron a cabo con liposomas cargados con  $K^+$ , igual que las vesículas y también pasados por una columna.

Se utilizaron cantidades conocidas de una solución estándar de KCl para calibrar la respuesta del electrodo en cada experimento.

#### 9) Medida del transporte de $Ca^{++}$ .

Se prepararon vesículas de la misma manera cargadas con  $K^+$  como se indicó en la medida del transporte de  $K^+$ .

Los movimientos de  $Ca^{++}$  se midieron usando un medio de reacción que contenía sacarosa 100 mM, MES-TEA 10 mM pH 6.5 y  $^{45}Ca^{++}$  150 uM, al cual se le adicionaban las vesículas preincubando 3 min a 30°C. Se tomaron alícuotas de 100 ul que se filtraron en columnas de Dowex AG 50W-X8 de 0.5 x 2 cm centrifugándolas durante 15 seg, tomando una muestra de 50 ul para contarla en un contador de centelleo Packard Tri-Carb 300. Posteriormente a la mezcla restante se le adicionó valinomicina 10 ng y/o A23187 3 uM o FCCP 0.1 uM. Se incubó 1 min más a 30°C y se tomaban alícuotas que se filtraban de la misma manera en las columnas y se midió su contenido de  $^{45}Ca^{++}$

## RESULTADOS

### Purificación de la membrana.

Al purificar la membrana por el método de Franzusoff y Cirillo (47) encontramos que además de la ATPasa, existían también actividades de fosfatasa, demostrables usando ADP o PNPP como sustrato, y de pirofosfatasa con PPI como sustrato. Estas actividades podían ser inhibidas por molibdato y NaF respectivamente, los cuales son inhibidores específicos para cada una de ellas. Con la adición de una centrifugación más de 36 000 rpm x 40 min a la técnica original se pudieron eliminar totalmente estas actividades y quedando solamente la actividad de ATPasa de la membrana plasmática. Esto sugiere que las otras actividades eran de enzimas solubles del sobrenadante que no se habían removido durante la primera centrifugación.

### Actividad de ATPasa de la membrana.

La actividad de ATPasa en la preparación purificada de membrana plasmática, medida a pH 6.5, varió entre 0.6 y 1.5  $\mu\text{moles}(\text{min} \times \text{mg})^{-1}$ , aunque en algunas preparaciones se encontraron actividades hasta de 2  $\mu\text{moles}(\text{min} \times \text{mg})^{-1}$ . Esta actividad es similar a la reportada en otras preparaciones (22,47). La enzima fue inhibida eficazmente por vanadato y DEB. Otros inhibidores no tan eficaces fueron TFE y DCCD, que hubieron de utilizarse a altas concentraciones. La oligomicina inhibió entre 5 y 10 %, y como era de esperarse la azida de sodio no inhibió (tabla 1).

Tabla I .- Actividad de ATPasa de la membrana plasmática purificada. Efecto de los inhibidores.

Condiciones Experimentales	Act. específica umoles/min/mg	Act. relativa % del control
control	1.48	100
oligomicina 10 ug	1.44	97
vanadato 100 uM	0.07	5
NaN <sub>3</sub> 300 uM	1.46	99
DEB 1 mM	1.12	76
TFE 250 uM	1.39	94
DCCD 100 uM	1.25	84

La actividad se midió según se describe en la metodología. Los inhibidores se adicionaron a las concentraciones indicadas, 2 min antes de iniciar la reacción con ATP, excepto el DCCD que se preincubó durante 20 min.

Al medir la actividad de ATPasa a pH 9 en la preparación de membranas obtenida, se comprobó que no existía contaminación con ATPasa mitocondrial al no obtenerse prácticamente ninguna actividad. Tampoco existía contaminación con ATPasa vacuolar ya que la preparación se inhibía totalmente con vanadato y la ATPasa vacuolar no es inhibida por este compuesto (19,23).

#### Formación de las vesículas.

A diferencia de lo reportado (47) sobre el tiempo de sonicación de 7 seg. para la formación de las vesículas, después de la congelación - descongelación, no fue posible obtener la fusión de los liposomas con los fragmentos de membrana plasmática. Esto fue verificado al centrifugar, la mezcla de membranas con liposomas sonicada 7 seg, en un gradiente de Percoll de 1.019 a 1.14 g/ml a 70 000g durante 45 min, donde se obtuvieron dos bandas, una correspondiente a los liposomas y otra a las membranas. Se observó también que las vesículas así preparadas tampoco eran capaces de generar un potencial de membrana.

Este problema se solucionó sonicando durante más tiempo, del orden de minutos. Sonicando de 3 a 5 min se obtuvo la fusión de los liposomas con las membranas, como se hizo evidente en el gradiente de Percoll al obtenerse una sola banda y con la capacidad de las vesículas de generar tanto un potencial de membrana como un gradiente de pH.

#### Microscopía electrónica.

Por microscopía electrónica usando tinción negativa, al observar la muestra de las membranas purificadas (fig.5) notamos que éstas no se encontraban



1 um

Fig. 5.- Microscopía electrónica de la membrana plasmática. 32 500 X.

vesiculadas; si no sólo existían fragmentos de membrana. Al llevar a cabo el procedimiento para formar las vesículas mencionado en la metodología, observamos (fig.6) que todos los fragmentos de membrana se fusionaron a liposomas, sin encontrar prácticamente ningún fragmento suelto.

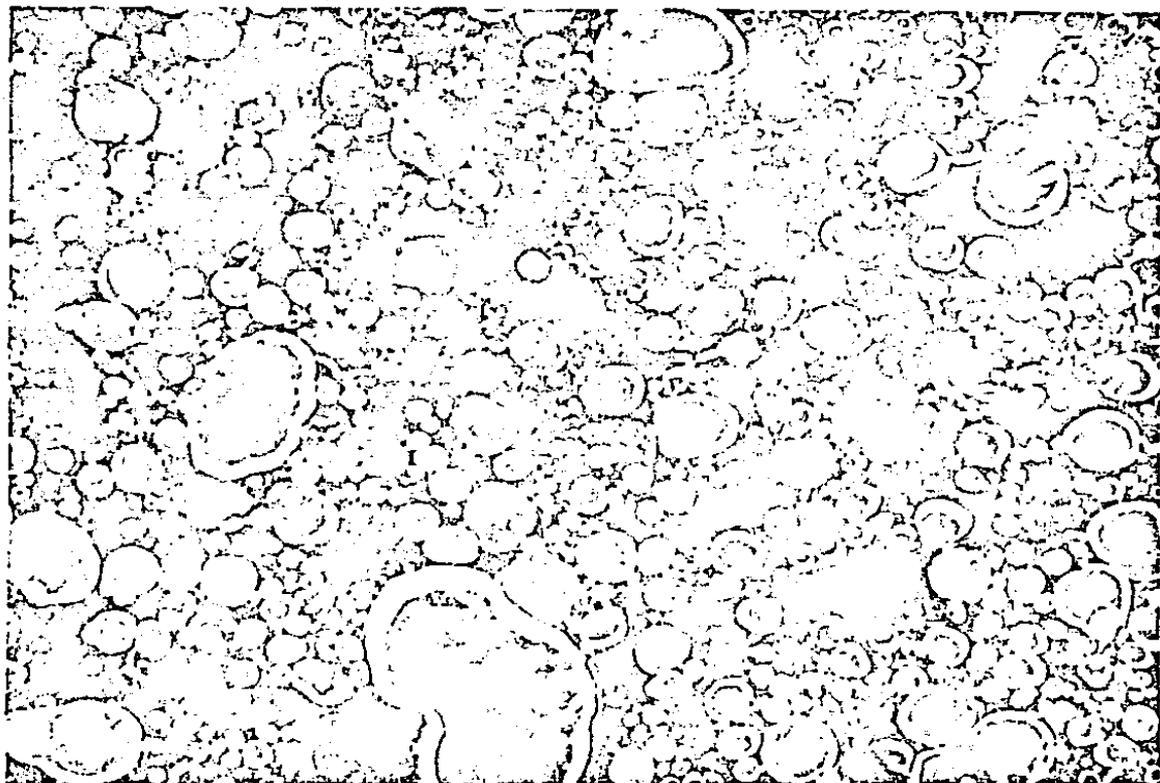
#### Detección de un potencial de difusión.

En experimentos preliminares realizados con las vesículas preparadas en MES-TEA 10 mM pH 6.5, KCl 100 mM, adicionadas a un medio sin  $K^+$ , es decir, con sacarosa 200 mM, MES-TEA 10 mM pH 6.5, al agregarles valinomicina (fig.7) se observó un potencial de difusión, negativo en el interior, el cual se pudo detectar por el apagamiento de la fluorescencia de la cianina DiSC<sub>3</sub>(3) y que fue sensible a desacoplantes como el CCCP. También se colapsó al añadir  $K^+$  al medio externo.

#### Actividad de ATPasa de la vesículas.

La actividad de ATPasa de las vesículas varió entre 0.6 y 1  $\mu\text{mol}$  (min x mg prot)<sup>-1</sup> (tabla II), similar a la obtenida con las membranas; además, la ATPasa mostró la misma sensibilidad a inhibidores que la observada en la preparación de membranas. Un hecho interesante es que la actividad de ATPasa de las vesículas se incrementó con lisolecitina (tabla III) y esta estimulación no se observó en la preparación de membranas.

Al adicionar ionóforos como el FCCP y la nigericina, a las vesículas, se obtuvo una estimulación muy pequeña, pero constante en la actividad; la valinomicina, en cambio, aún añadida en presencia de KCl no produjo ningún aumento en la actividad (tabla II).



┌  
└  
1 um

Fig. 6 .- Microscopía electrónica de las vesículas. 6 666 X.

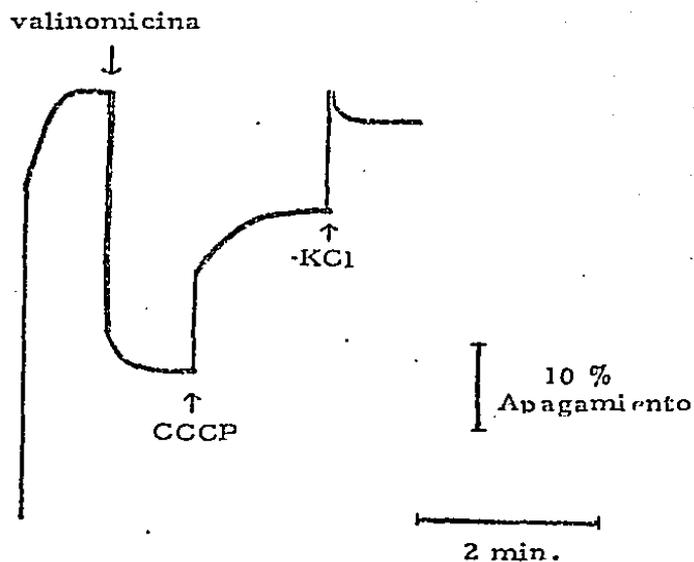


Fig. 7.- Apagamiento de la fluorescencia de  $\text{DiSC}_3(3)$  en vesículas cargadas con 100 mM de KCl como se indica en la metodología, adicionadas a un amortiguador de sacarosa 200 mM, MES-TEA 10 mM pH 6.5. La concentración de  $\text{DiSC}_3(3)$  fue de 4  $\mu\text{M}$ , adicionando valinomicina 1.5 ng, CCCP 1  $\mu\text{M}$ , KCl 5 mM donde se indica.

Tabla II .- Actividad de ATPasa en las vesículas de membrana plasmática. Efecto de inhibidores.

Condiciones experimentales	Act. específica nmoles/min/mg	Act. relativa % del control
control	936	100
oligomicina 10 ug	893	95
vanadato 100 uM	92	10
NaN <sub>3</sub> 300 uM	908	97
DEB 500 uM	324	35
TFE 500 uM	777	83
DCCD 143 uM	797	85
FCCP 10 uM	1008	108
valinomicina 50 ng KCl 10 mM	956	103
nigericina 10 ug KCl 10 mM	1033	110

Las vesículas se prepararon según se indica en la metodología. Los inhibidores se adicionaron a las concentraciones indicadas, 2 min antes de iniciar la reacción con ATP, excepto el DCCD que se preincubó 20 min.

Tabla III.- Efecto de la lisolecitina sobre la actividad de la ATPasa en vesículas y membrana plasmática.

	Act. específica 2nmoles/min/mg	Act. relativa % del control
<b>Membrana plasmática</b>		
control	836	100
lisolecitina	844	101
<b>Vesículas</b>		
control	796	100
lisolecitina	929	117

El experimento se llevó a cabo como se indica en la metodología, adicionando 0.01 % de lisolecitina.

### Generación de un potencial de membrana.

Las ATPasas, al hidrolizar el ATP bombean protones hacia el interior de las vesículas y generan un potencial de membrana, positivo en el interior así como un gradiente de pH ácido en el interior. Con la utilización del oxonol que es un colorante con carga negativa se puede detectar el potencial de membrana y con el ACMA que se acumula en los lugares de mayor concentración de  $H^+$ , y apaga su fluorescencia es posible determinar el gradiente de pH.

Al añadir ATP a las vesículas en presencia de oxonol V se encontró un decremento de la fluorescencia (fig.8), probablemente debido a la formación de un potencial, ya que disminuyó muy ligeramente al agregar oligomicina y completamente por la adición de vanadato, DEB, TFE. Las concentraciones utilizadas, tanto de DEB como de TFE fueron menores que las utilizadas para inhibir la actividad de ATPasa, debido que apagan por si solos la fluorescencia del oxonol V, y por ello se utilizaron las que no la afectaban. El potencial generado por hidrólisis de ATP también podía ser revertido por 1799 y parcialmente por nigericina (D) probablemente por un efecto desacoplante de la misma.

La adición de aniones permeantes como el  $NO_3^-$  o el  $SCN^-$  (fig. 9 ) produjo una disminución en la magnitud del potencial de membrana generado por hidrólisis de ATP medido por el apagamiento del oxonol V probablemente por la facilidad de estos aniones de difundir a través de la membrana, neutralizando parcialmente el potencial de membrana con su carga negativa.

La adición de aniones permeantes como el  $NO^-$  o el  $SCN^-$  (fig.9) produjo una disminución en la magnitud del potencial de membrana generado por hidrólisis

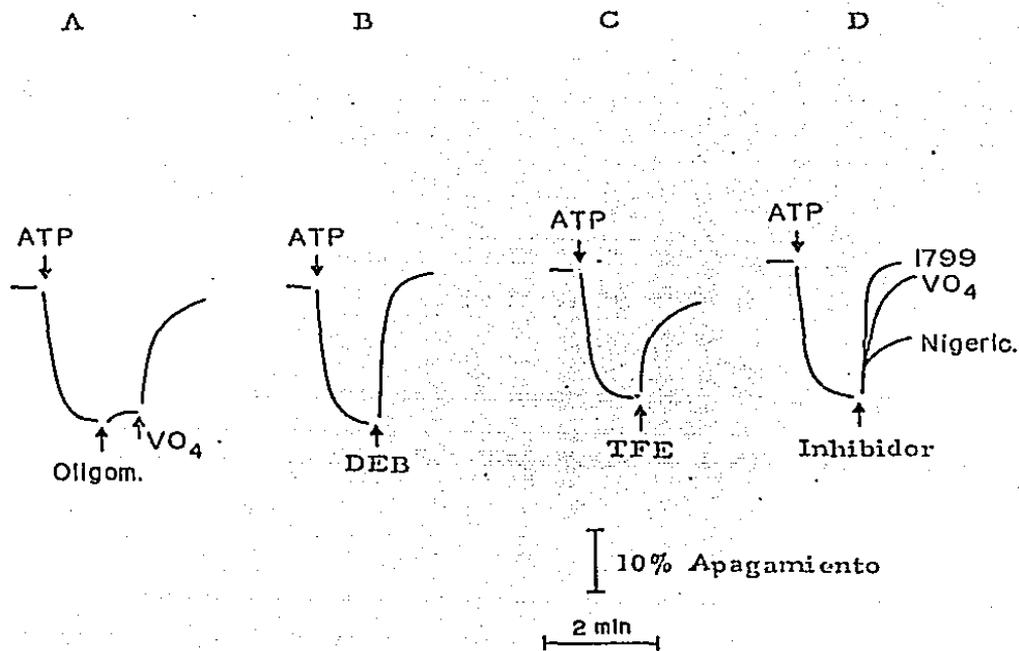


Fig. 8 -- Apagamiento de la fluorescencia del oxonol V después de la adición de ATP en las vesículas de membrana plasmática. Efecto de inhibidores.

Las vesículas se prepararon en sacarosa 20 mM, EDTA 1 mM, MES-TEA 10 mM pH 6.5 y se adicionaron en un amortiguador sacarosa 20 mM, MES-TEA 10 mM pH 6.5 (100 ug de proteína en un volumen final de 2 ml), bajo las condiciones indicadas en la metodología para monitorear el oxonol V. Las adiciones fueron: A) oligomicina 10 ug, vanadato 100 uM. B) DEB 11 uM. C) TFE 60 uM. D) nigericina 8 ug, 1799 10 uM, vanadato 100uM.

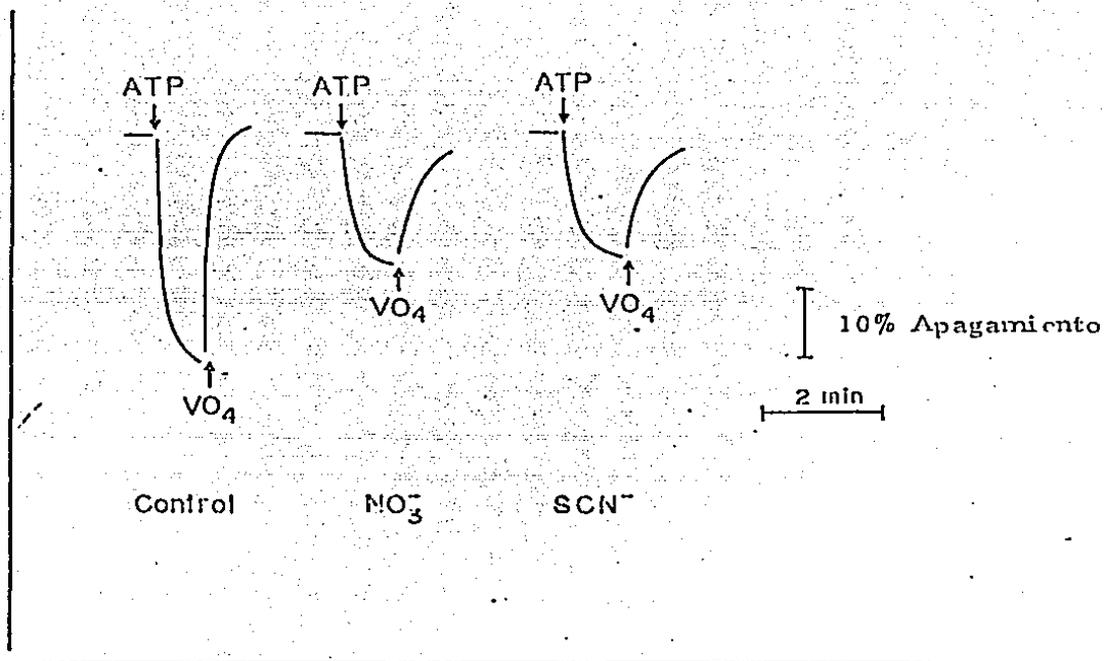


Fig. 9 .- Efecto del  $\text{NO}_3^-$  y  $\text{SCN}^-$  en el apagamiento de la señal de oxonol V. Los experimentos se realizaron según se describe en la figura 8. Donde se indica se adicionó al medio  $\text{NO}_3^-$  100 mM,  $\text{SCN}^-$  100 mM.

de ATP, medido por el apagamiento del oxonol V, probablemente por la facilidad de éstos aniones de difundir a través de la membrana, neutralizando parcialmente el potencial de membrana, positivo en el interior, por su carga negativa. Este potencial fue revertido totalmente por vanadato.

El mismo efecto de los aniones sobre la magnitud del potencial generado, se observó en vesículas preparadas y/o incubadas con sacarosa 20 mM, KCl 10 mM o acetato de potasio 10 mM (fig.10). En vesículas cargadas con 10 mM de KCl (fig.10 A) o 10 mM de acetato de potasio (fig.10 C) adicionadas aun medio con sacarosa 20 mM, MES-TEA 10 mM pH 6.5, si se comparan los controles con los de la fig.9 que son vesículas cargadas con sacarosa 20 mM, los potenciales obtenidos son aproximadamente un 30 % mayores.

#### Formación de un gradiente de pH.

Siguiendo el apagamiento de la fluorescencia del ACMA al adicionar ATP-Mg, en presencia de  $\text{NO}^-$  en el medio, a diferentes tiempos de sonicación se observó la capacidad de las vesículas de generar un gradiente de pH. En la figura 11 se observa que a los dos minutos de sonicación, las vesículas ya están selladas y hasta los 15 min, aunque disminuye un poco el gradiente de pH formado, la señal es buena. A estos mismos tiempos de sonicación se midió la actividad de la ATPasa, tanto de las vesículas como de las membranas solas y se encontró que hasta los 15 min de sonicación no se produce disminución de la actividad. Por esta razón, aunque con pequeños tiempos de sonicación (de 3 a 5 min) era posible obtener vesículas selladas, se escogió un tiempo estándar de 10 min.

El efecto del DEB y TFE sobre la formación del gradiente de pH no pudieron

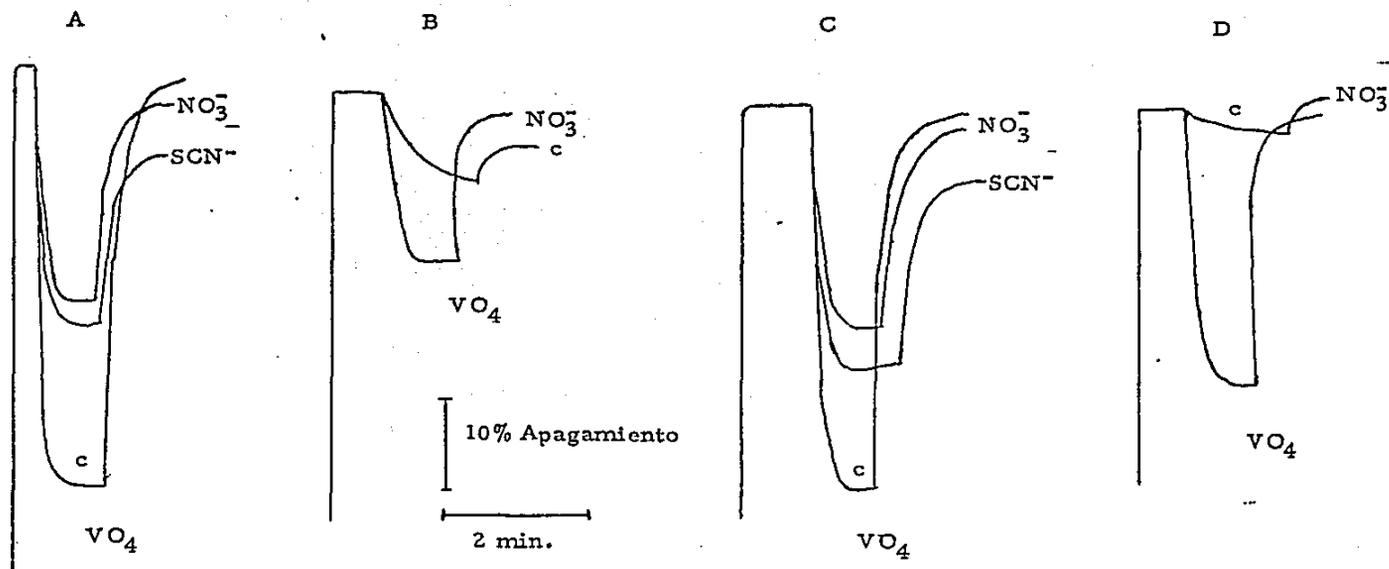


Fig. 10 .- A) Apagamiento de la fluorescencia de oxonol V por adición de ATP en vesículas cargadas con KCl 10 mM, en un medio externo de sacarosa 20 mM, MES-TEA 10 mM pH 6.5. Efecto del  $\text{NO}_3^-$  100 mM y  $\text{SCN}^-$  100 mM.

B) Apagamiento de la fluorescencia del ACMA bajo las condiciones indicadas en la metodología en las mismas vesículas que en A.

C) Apagamiento de la fluorescencia del oxonol V por adición de ATP en vesículas cargadas con acetato de  $\text{K}^+$  10 mM, en el mismo medio que en A.

D) Apagamiento de la fluorescencia del ACMA en las mismas vesículas que en C.

Tanto el potencial de membrana como el gradiente de pH formados fueron colapsados con vana dato 100  $\mu\text{M}$ . c = control

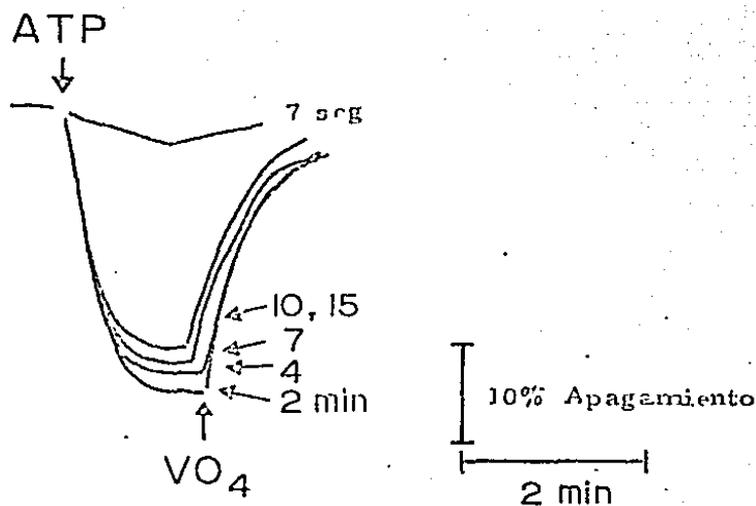


Fig. 11.- Efecto del tiempo de sonicación sobre la capacidad de las vesículas de generar un gradiente de pH, monitoreado con ACMA. El experimento se llevó a cabo como se describe en la metodología en vesículas preparadas en sacarosa 20 mM, EDTA 1 mM, MES-TEA 10 mM pH 6.5, incubadas en el mismo medio sin EDTA en presencia de NaNO<sub>3</sub> 100 mM. La variable fue el tiempo de sonicación de las membranas plasmáticas con los liposomas después de haberlas congelado y descongelado 2 veces. La concentración de vanadato fue 100  $\mu$ M.

ser medidos ya que por sí solos incrementaban la fluorescencia del ACMA, aún a muy bajas concentraciones.

Al adicionar  $\text{NO}_3^-$  el gradiente de pH se incrementó como era lo esperado, al haberse disminuido con el anión el potencial de membrana y por lo tanto la diferencia de potencial eléctrico (fig.12). Este gradiente también es colapsado por vanadato o por el desacoplante 1799. En las vesículas cargadas con KCl 10 mM (fig.10 B) o acetato de potasio 10 mM (fig.10 D) los gradientes de pH obtenidos en presencia de  $\text{NO}_3^-$  son mayores que en las vesículas cargadas con sacarosa 20 mM. El  $\text{SCN}^-$  no se pudo utilizar porque apaga la fluorescencia del ACMA.

#### Efecto del DCCD y la valinomicina sobre la formación del potencial y el gradiente de pH.

Uno de los inhibidores de la ATPasa de membrana plasmática es el DCCD (11); por lo que se hicieron experimentos para determinar su acción inhibitoria sobre la generación del potencial y el gradiente de pH, los cuales mostraron que aun utilizando altas concentraciones del inhibidor y preincubando éste durante 20 min con las vesículas antes del ensayo, se observó una inhibición parcial (fig.13). Esto está de acuerdo con la relativa insensibilidad observada en la actividad de la ATPasa.

La valinomicina, que al sacar  $\text{K}^+$  debería disminuir el potencial de membrana, y especialmente si se compara con el nitrato, produce sólo una pequeña disminución del apagamiento del oxonol V, aún cuando la incubación y preparación de las vesículas se lleve a cabo con KCl 10 mM (fig.14); lo mismo se observó en las vesículas cargadas con acetato de potasio.

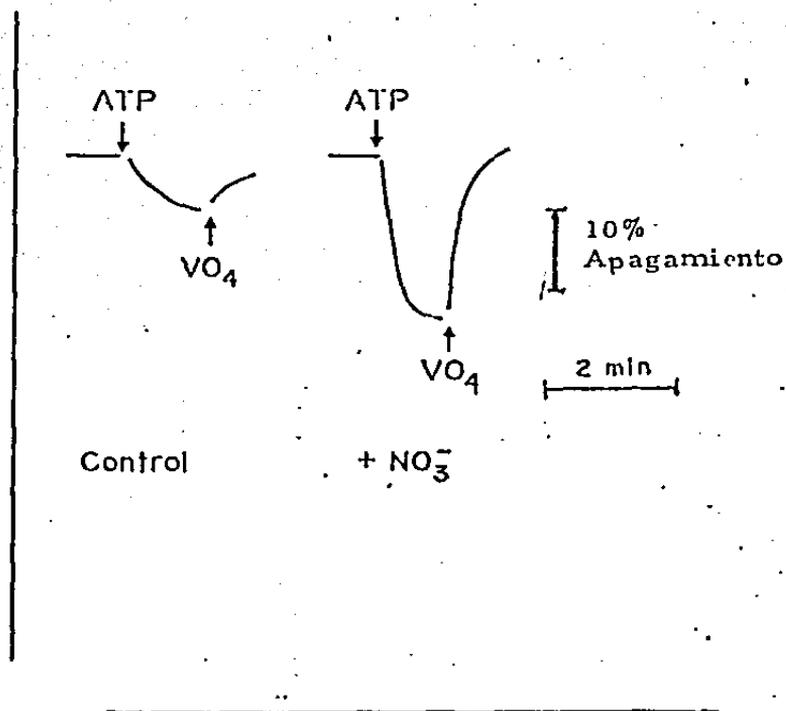


Fig. 12 .- Generación de un gradiente de pH por apagamiento de la fluorescencia del ACMA según se indica en la metodología. Las vesículas se prepararon y probaron igual que en la figura 11.  $\text{NO}_3^-$  100 mM se adicionó a la mezcla.

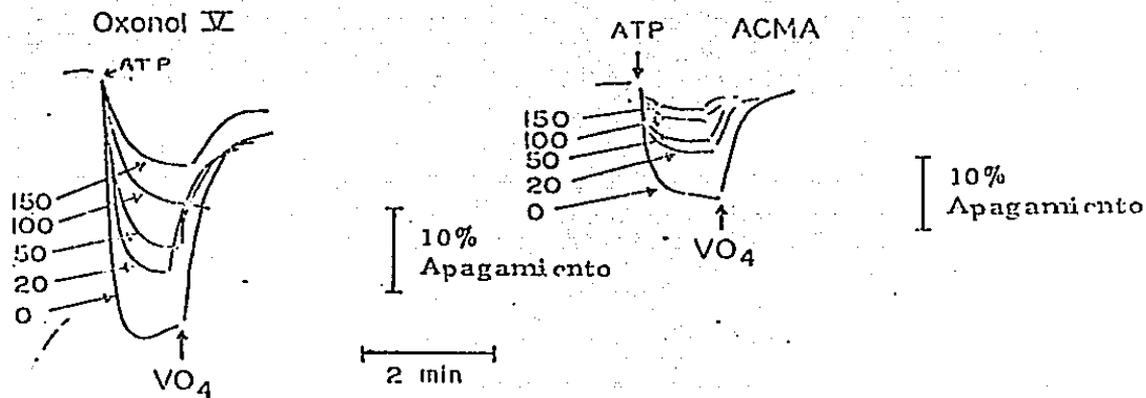


Fig. 13 .- Efecto del DCCD sobre la generación del potencial de membrana y gradiente de pH medidos con oxonol V y ACMA respectivamente. Las condiciones experimentales son las mismas que en la figura 8 y 11 pero antes de la adición de ATP las vesículas se preincubaron 20 min. con DCCD a las concentraciones  $\mu\text{M}$  indicadas en la figura.

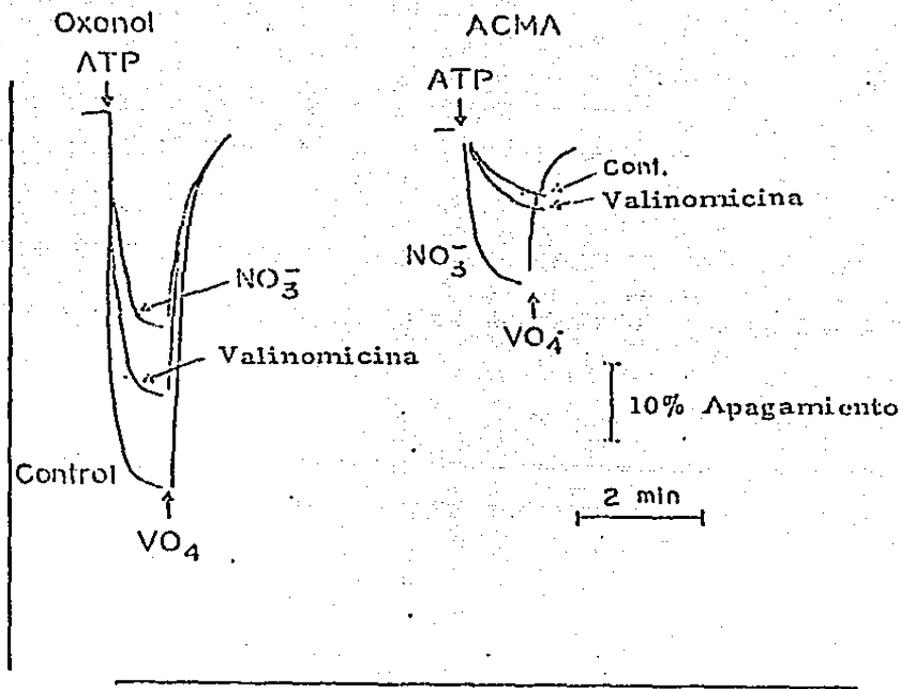


Fig. 14 .- Efecto de la valinomicina sobre el potencial de membrana y gradiente de pH monitoreado con oxonol V y ACMA respectivamente en vesículas cargadas con KCl 10 mM adicionadas en sacarosa 20 mM, MES-TEA 10 mM pH 6.5. Se incluye un trazo con nitrato para comparación.

### Transporte de $K^+$ .

Para medir la salida de  $K^+$  de las vesículas, lo cual equivaldría a la entrada del catión en las células, ya que las vesículas están invertidas, se cargaron con 50 mM de KCl de la manera mencionada en la metodología; posteriormente se pasaron por una columna de Sephadex G 50 fino, para quitar el  $K^+$  externo que pudiera interferir con la detección del electrodo y poder medir la salida de  $K^+$  de las vesículas.

Al adicionar las vesículas al medio se observó que no están totalmente libres de  $K^+$ , ya que se obtiene una señal equivalente a 15  $\mu M$  de  $K^+$  y existe además una salida pasiva lenta, como se observa en la fig. 15. Al adicionar las vesículas al medio con ATP-Mg 1 mM existe una salida mayor y más rápida de  $K^+$  hasta 50  $\mu M$ , la cual no se observa en liposomas control en las mismas condiciones. A estas concentraciones de ATP-Mg el potencial de membrana generado es menor que el que se observó con 5 mM de ATP-Mg que fue el utilizado para todos los demás experimentos, esto se debió a que el  $Mg^{++}$  5 mM interfería con el electrodo en la medida de la salida de  $K^+$ .

### Transporte de $Ca^{++}$ .

La adición de valinomicina a vesículas cargadas con KCl 50 mM, genera un potencial artificial negativo dentro, que indujo la entrada de  $^{45}Ca^{++}$  de 24 nmoles de  $^{45}Ca/mg$  de proteína; si además se adiciona un ionóforo de  $Ca^{++}$  como el A23187, la entrada es de 61 nmoles  $^{45}Ca/mg$  de proteína. El efecto inductor de la valinomicina sobre la entrada de  $^{45}Ca^{++}$  es disminuido por un desacoplante (fig.16).

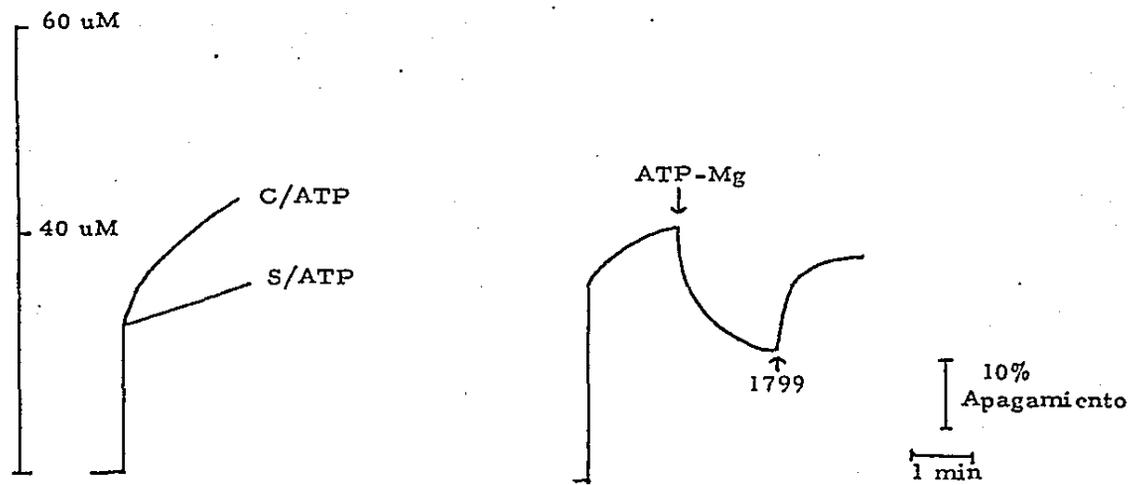


Fig 15.- Medición de la salida de  $K^+$  en vesículas cargadas con 50 mM de KCl, en ausencia y en presencia de ATP 1 mM. Las condiciones del experimento se indican en la metodología. En la barra se indica la concentración total de  $K^+$  en el medio externo. Se muestra un trazo de potencial de membrana medido con Oxonol V bajo las mismas condiciones en que se midió la salida de  $K^+$ .

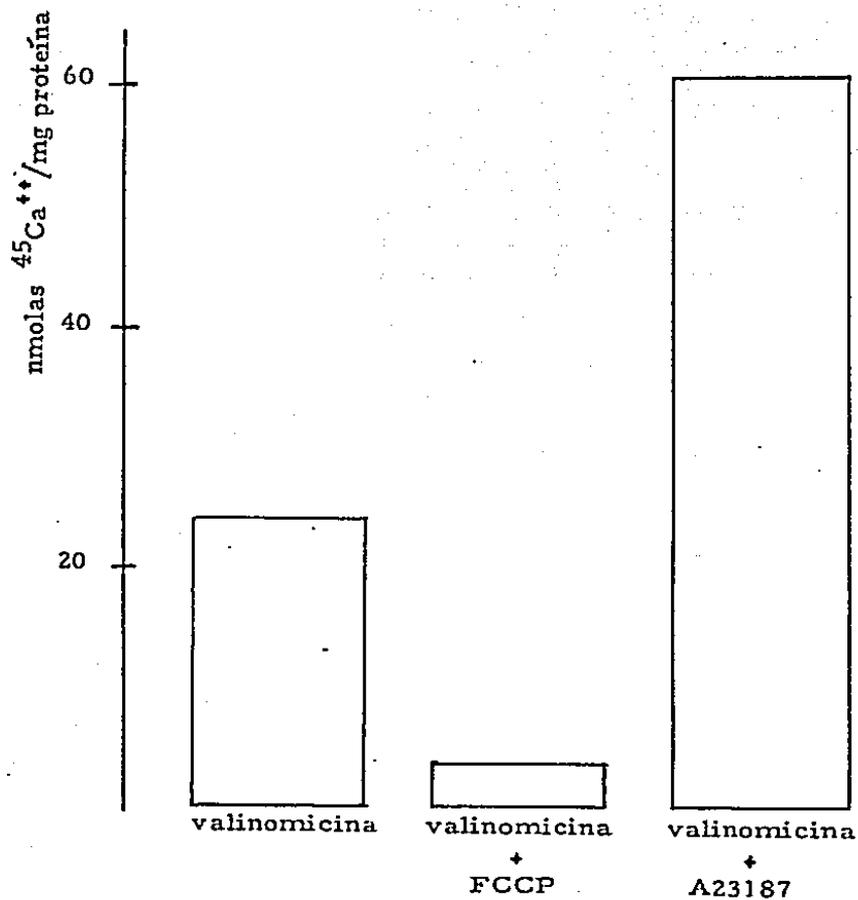


Fig 16.- Captación de  $^{45}\text{Ca}^{++}$  en vesículas cargadas con KCl 50 mM al adicionar valinomicina 10 ng, FCCP 0.1  $\mu\text{M}$ , A23187 3  $\mu\text{M}$  según se indica en la figura.

## DISCUSION

### 1) Caracterización de la membrana plasmática purificada.

En la membrana plasmática purificada se determinó actividad de ATPasa, sensibilidad a diferentes inhibidores y a distintos pH. La inhibición del 5 al 10 % producida por la oligomicina probablemente no se deba a que la preparación se encuentra contaminada con ATPasa mitocondrial, ya que existen reportes (11,47) de que la ATPasa plasmática es inhibida por la oligomicina hasta en un 15 a 20 % esto aunado a que no se obtuvo actividad a pH 9 nos confirma lo anterior. También se descartó la posibilidad de una contaminación con ATPasa vacuolar ya que la actividad de ATPasa medida fue sensible a la inhibición por vanadato y la ATPasa vacuolar no lo es (19,23).

### 2) Formación de vesículas selladas.

En la formación de las vesículas, existía discrepancia con los datos de Franzusoff y Cirillo (47) respecto al tiempo de sonicación para obtener la fusión de las membranas con los liposomas, esto se debió probablemente al sonicador de baño utilizado, ya que en nuestro caso se requirieron tiempos más largos de sonicación que oscilaron entre 2 y 10 min que correspondió a la clarificación de la muestra, por lo que se tomó este parámetro como índice de que se había alcanzado la fusión. Esto se pudo comprobar al medir la existencia de un potencial de membrana y un gradiente de pH.

### 3) Actividad de ATPasa.

La actividad de ATPasa tanto de las membranas como de las vesículas se midió en el amortiguador de sacarosa sin iones adicionados tratando de que las condiciones de incubación fueran las más sencillas posibles y probar que la preparación de vesículas funcionaba bien en estas condiciones, ya que la existencia de iones en el medio, estimula la actividad de la ATPasa (45,47).

Como existen variaciones de la actividad específica entre diferentes lotes de levadura, los valores reportados en las tablas no son estadísticos; sin embargo, los efectos de los inhibidores en cada preparación fueron similares. Por otro lado, con cada preparación de membrana los experimentos de actividad fueron repetidos al menos tres veces bajo las mismas condiciones con resultados idénticos, preparando para cada uno de ellos nuevos liposomas y vesículas. Probablemente las variaciones observadas entre cada lote de levadura se podrían atenuar haciendo un "pool" de membranas purificadas de diferentes paquetes para la preparación de las vesículas.

#### a) Efecto de ionóforos y desacoplante.

Con respecto a la actividad de ATPasa medida en las vesículas en presencia de los diferentes inhibidores, desacoplantes y ionóforos, y a diferencia de lo esperado, con el FCCP y la nigericina, se observó solamente una pequeñísima estimulación lo cual indicaría un grado muy bajo de acoplamiento de la actividad de la ATPasa con el bombeo de protones, en comparación con las preparaciones reportadas por otros autores con la enzima purificada incorporada a liposomas (18,26,34,35); esto podría deberse probablemente a que la inserción de las ATPasas en la membrana de nuestra preparación no es la adecuada o que las

vesículas se encuentran poco selladas. La valinomicina no estimuló la actividad y esto coincide con el hecho de que éste antibiótico tampoco disminuyó el potencial de membrana como ocurrió con el nitrato como se discutirá más adelante.

#### 4) Formación de un potencial de difusión.

Se observó la formación de un potencial de difusión en vesículas cargadas con 100 mM de KCl al adicionar valinomicina, lo que parece sugerir que las vesículas si se encuentran selladas lo suficiente para generar un potencial aunque por los datos de los ionóforos sobre la actividad de la ATPasa no nos indiquen esto.

Otro dato que apoya el hecho de que se encuentran selladas es que al adicionar lisolecitina a las vesículas éstas se rompen, exponiendo así ATPasas que se encontraban en el interior vesicular que no eran capaces de hidrolizar el ATP añadido, observándose entonces un aumento en la actividad de las ATPasas. Este aumento de actividad no se debe a un efecto de la lisolecitina sobre la propia ATPasa ya que con las membranas solas, donde todas las ATPasas se encuentran expuestas al medio, este aumento no se observó.

Es más probable que los resultados obtenidos con los ionóforos se deban a una mala orientación de las moléculas de ATPasa en las vesículas aunque algunas que se encuentran bien orientadas, si son capaces de generar un potencial de membrana y un gradiente de pH al actuar como bomba de protones.

#### 5) Potencial de membrana y gradiente de pH.

El pH óptimo reportado por otros autores para la actividad de la ATPasa varía

entre 5.5 y 7.5 (11,12,13,14,15,16,17). En el presente trabajo se utilizó el pH de 6.5 en todos los experimentos ya que el oxonol V utilizado para medir el potencial de membrana, disminuye mucho su fluorescencia a valores de pH menores de 6, debido a que la forma protonada del colorante tiene poca solubilidad en medio acuoso (67), y al probar la capacidad de generación de un potencial de membrana en las vesículas a diferentes pHs externos, encontramos un máximo a 6.5. Esto difiere de lo encontrado por Perlin et al. (45) quienes observaron un óptimo a pH 7.2 para las vesículas de N.crassa. Con el gradiente de pH, medido con ACMA, la señal también fue mejor a pH 6.5. Por último, el pH óptimo para la actividad de ATPasa en nuestras condiciones fue de 6.5.

La manera en que actúan los colorantes fluorescentes para ser sensibles al potencial de membrana generado es, para el caso de la cianina con la cual se midió el potencial de difusión, comportándose como un catión permeante que al entrar a las vesículas en respuesta a un potencial, forma agregados no fluorescentes del colorante a altas concentraciones internas de la forma libre. Este mecanismo no funciona para el oxonol V ya que no se han detectado agregados en solución acuosa a pH 6.5, a las cuales lo estamos utilizando, aún a concentraciones hasta de 26  $\mu\text{M}$  (65). Su acción se explica por efecto del campo eléctrico asociado al potencial transmembranal, el cual cambia la absorción del colorante (65).

Existe otro mecanismo que dice que el potencial transmembranal determina la unión del colorante a la membrana y los cambios ópticos se originan por la diferencia entre el colorante libre y el unido (66,67).

El potencial de membrana generado por la actividad de la ATPasa al adicionar ATP-Mg disminuye en presencia de aniones permeantes como el tiocianato y el nitrato en el medio y congruentemente con el hecho de que la ATPasa es electrogénica encontramos que el gradiente de pH formado aumenta. Este efecto del tiocianato y el nitrato pueden explicarse por un efecto compensatorio de carga al permear la

membrana, disminuyendo el potencial de membrana y como consecuencia permitiendo que aumente el bombeo de protones (45,47). Aunque las concentraciones usadas de estos aniones son muy altas, el efecto observado no parece deberse a un efecto caotrópico, pues la señal se revierte al adicionar los inhibidores y si se adicionan a un medio con la misma concentración de KCl que la utilizada de los aniones no sucede nada.

En este trabajo se corroboró que el movimiento pasivo de iones que colapsa el potencial de membrana, estimula el bombeo de protones. Este es el caso de la valinomicina, nitrato, o tiocianato. A este respecto la ATPasa de membrana plasmática difiere de la ATPasa  $H^+/K^+$  de la mucosa gástrica que funciona de una manera electroneutra (48).

#### a) Efecto de inhibidores.

Para inhibir la formación del gradiente electroquímico, encontramos que las concentraciones usadas de DCCD, TFE y DEB para las mediciones de los cambios de fluorescencia, son menores que las utilizadas en la actividad de ATPasa y sin embargo se obtienen valores de inhibición similares. Lo más probable es que exista una fracción de ATPasas desacopladas menos sensibles al DCCD que no intervengan en la generación del potencial de membrana y el gradiente de pH pero que sí sean detectadas al medir la actividad.

#### 6) Transporte de $K^+$ y $Ca^{++}$ .

Al estudiar el transporte de  $K^+$ , con un electrodo selectivo, la salida pasiva inicial que se observó se puede deber a que el pH interno de las vesículas es un poco más alcalino de lo esperado lo cual provoca una entrada pasiva de  $H^+$ , que

puede estar dada ya sea por un potencial de membrana que existe en este caso, o por el gradiente de pH (37), así como a que la concentración interna de  $K^+$  es mayor que la externa. Además el hecho de que a pH 6.5 el FCCP saque  $K^+$  (datos no mostrados) nos indica que existe una entrada pasiva de  $H^+$  al interior de las vesículas en ausencia de ATP-Mg, que provoca una salida pasiva de  $K^+$ , aunque teóricamente el pH interno y externo de las vesículas sea el mismo. Al adicionar ATP-Mg este intercambio se hace activo. En cambio con el  $Ca^{++}$  no pudimos ver el efecto del ATP-Mg sobre los movimientos de este catión ya que el  $Mg^{++}$  interfería con las determinaciones, y provocaba que las vesículas se adherieran a la columna utilizada, además que el  $Ca^{++}$  en presencia de  $Mg^{++}$ , inhibe la actividad de ésta ATPasa (12,22). Sin embargo, al adicionar valinomicina en vesículas cargadas con  $K^+$ , generamos un gradiente de  $K^+$  que nos permitió observar los movimientos de  $Ca^{++}$  al interior de las vesículas producidos por dicho gradiente.

Los resultados obtenidos demuestran que es posible lograr una preparación de vesículas selladas de membrana plasmática de levadura mediante una modificación del procedimiento de Franzusoff y Cirillo (47).

Esta preparación de membranas parece tener ventajas sobre las reportadas por Fuhrmann (16), y Peters y Borst-Pauwels (14); en dichas preparaciones se observaron muy bajas actividades de ATPasa y no fue posible generar un potencial de membrana, probablemente porque no se encontraban selladas. Recientemente Ahlers (22) obtuvo una preparación de vesículas de membrana de S.cerevisiae que parece adecuada para utilizarse en estudios del transporte de solutos.

El sistema de vesículas es especialmente valioso para investigar el transporte de solutos que no se alteran químicamente durante su movimiento a través de la membrana; esta preparación de vesículas ofrece muchas ventajas,

la primera es que se encuentran todos los componentes de la membrana plasmática, y con ello se abre la posibilidad de estudiar el transporte de metabolitos tales como  $\text{Ca}^+$ ,  $\text{K}^+$ , aminoácidos, carbohidratos que dependan del gradiente de potencial electroquímico generado por la ATPasa de protones. La segunda es que podemos estudiar los efectos de diferentes medios (interno y externo) y de diversas composiciones lipídicas de las vesículas sobre el transporte de los metabolitos. La tercera es que la preparación de las vesículas se realiza en aproximadamente 1.5 hr, se pueden modificar los tiempos de sonicación; desde los 5 min o menos observamos las vesículas selladas y esto puede ser importante para el caso de acarreadores sensibles a largos tiempos de sonicación como el acarreador de glucosa (47)

BIBLIOGRAFIA

- 1) Rose, H.A. and Harrison, J.S. 1971. The Yeast. vol 1. Academic Press. London. pág. 508.
- 2) Goffeau, A. and Slayman, C.W. 1981. The Proton Translocating ATPase of the Fungal Plasma Membrane. *Biochimica et Biophysica Acta*. 639, 197-223.
- 3) Peña, A. 1975. Studies on the mechanism of  $K^+$  Transport in yeast. *Arch. Biochem. Biophys.* 167, 397-409.
- 4) Borbolla, M. and Peña, A. 1980. Characteristics of  $Ca^{++}$  uptake by yeast cells. *J. Memb. Biol.* 54, 149-156.
- 5) Peña, A. 1978. Effect of ethidium bromide on  $Ca^{++}$  uptake in yeast. *J. Memb. Biol.* 42. 199- 213 .
- 6) Seaston, A. et.al. 1973. The absorption of protons with specific aminoacids and carbohydrates in yeast. *Biochem. J.* 134, 1031-1043.
- 7) Cockburn, M, et.al. 1975. The stoicheiometry of the absorption of protons with phosphate and L-glutamate by yeast of the genus Saccharomyces cerevisiae *Biochem. J.* 146, 705-712.
- 8) Van den Broek, P.J.A. and Van Stevenick, J. 1982. Kinetic analisis of  $H^+$ /methyl B-D-Thiogalactoside transport in *Saccharomyces fragilis*. *Biochim. Biophys. Acta.* 693, 213-220.
- 9) Eddy, A.A. and Indge, K.J. 1962. The dependense of aminoacid transport in yeast on both energy supply and intracelular potassium ions. *Biochem. J.* 82, 15-16.
- 10) Malpartida, F. and Serrano, R. 1981. Reconstitution of the proton translocating adenosin triphosphatase of the yeast plasma membrane. *J. Biol. Chem.* 256:9, 4175-4177.
- 11) Delhez, J. et.al. 1977. Comparison of the properties of plasmamembrane - bound and mitochondria - bound ATPase in the yeast Schizosaccharomyces pombe. *Eur. J. Biochem.* 79, 319-328.
- 12) Blasco, F. et.al. 1981 Characterization of the plasmamembrane ATPase of Candida tropicalis *Biochimie extrait du tome 63 n- 6, 507-514.*
- 13) Bowman, B.J. and Slayman, C.W. 1979. The effects of vanadate on the plasma membrane ATPase of Neurospora crassa. *J. Biol. Chem.* 254:8, 2928-2934.
- 14) Peters, P.H.J. and Borst Pauwels, G.W.F.H. 1979. *Physiol. Plant.* 46, 330-337.
- 15) Christensen, M.S. and Cirillo, V. 1972. Yeast Membrane Vesicles: Isolation and general characteristics. *J. Bacteriol.* 110, 1190-1205.
- 16) Fuhrman G.F. et.al. 1974. Preparation and identification of yeast plasma membrane vesicles. *Biochim. Biophys. Acta.* 363, 295-310.

- 17) Willsky, G.R. 1979. Characterization of the Plasma Membrane Mg-ATPase of the Yeast Saccharomyces cerevisiae. J. Biol. Chem. 254:9, 3326-3332.
- 18) Bowman, E. and Bowman, B.J. 1982. Identification and properties of an ATPase in vacuolar membranes of Neurospora crassa. J. of Bacteriology 151:3 1326-1337.
- 19) Kakinuma, Y. et.al. 1981. Properties of H<sup>+</sup> translocating adenosine triphosphatase in vacuolar membranes of Saccharomyces cerevisiae. J. Biol. Chem. 256, 10859-10863.
- 20) Ahlers, J. 1981. Temperature effects on kinetic properties of plasma membrane ATPase from the yeast Saccharomyces cerevisiae. Biochim. Biophys. Acta. 649, 550-556.
- 21) Bowman, B.J. and Slayman, C.W. 1979. The effects of vanadate on the plasma membrane ATPase of Neurospora crassa. J. Biol. Chem 254:8, 2928-2934.
- 22) 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.
- 23) Bowman, E.J. 1983. Comparison of the vacuolar membrane ATPase of Neurospora crassa with the mitochondrial and plasma membrane ATPases. J. Biol. Chem. 258:24, 15238-15244.
- 24) Uchida, E. et.al. 1985. Purification and properties of H<sup>+</sup> translocating, Mg-Adenosine Triphosphatase from vacuolar membranes of Saccharomyces cerevisiae. J. Biol. Chem. 260:2, 1090-1095.
- 25) 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.
- 26) Serrano, R. 1980. Effect of ATPase inhibitors on the proton pump of respiratory-deficient yeast. Eur. J. Biochem. 105, 419-424.
- 27) Dufour, J.P. et.al. 1980. Plasma Membrane ATPase of Yeast. J. Biol. Chem. 256:12, 5735-5741.
- 28) Macara, I.G. 1980. Vanadium - an element in search of a role. TIBS. April 92-94.
- 29) Addison, R. and Scarborough, G. 1981 Solubilization and Purification of the Neurospora Plasma Membrane H<sup>+</sup> ATPase J. Biol. Chem. 256:24, 13165-13171.
- 30) Dufour, J.P. and Coffeau, A. 1978. Solubilization by Lysolecithin and Purification of the Plasma Membrane ATPase of the Yeast Schizosaccharomyces pombe. J. Biol. Chem. 258:19, 7026-7032.
- 31) Racker, E. 1979. Reconstitution of Membrane Processes. Methods in Enzymology vol.55, 699-709.
- 32) Darszon, A. 1983. Strategies in the Reassembly of Membrane Proteins into Lipid

- Bilayer System and their Functions Assay. *J. of Bioenergetics and Biomembranes*. 15:6, 321-334.
- 33) Villalobo, A. et.al. 1981. Electrogenic Proton Translocation Coupled to ATP hydrolysis by the Plasma Membrane Mg-dependent ATPase of Yeast in Reconstituted Proteoliposomes. *J. Biol. Chem.* 256:23, 12081-12087.
- 34) Dufour, J.P. et.al. 1981. Active Uptake in Lipid Vesicles Reconstituted with the Purified Yeast Plasma Membrane ATPase. *J. Biol. Chem.* 257:16, 9365-9371.
- 35) Dufour, J.P. and Tsong, T.Y. 1982 ATP-dependent proton pumping catalyzed by the purified yeast plasma membrane ATPase reconstituted into phospholipid vesicles. *Biophys. J.* 37, 96-97.
- 36) Villalobo, A. 1982. Potassium transport coupled to ATP hydrolysis in reconstituted proteoliposomes of yeast plasma membrane ATPase. *J. Biol. Chem.* 257:4, 1824-1828.
- 37) Villalobo, A. 1984. Energy-dependent  $H^+$  and  $K^+$  translocation by the reconstituted yeast plasma membrane ATPase. *Can. J. Biochem. Cell Biol.* 62, 865-877.
- 38) Borst Pauwels, G.W.F.H. 1981. Ion Transport in Yeast. *Biochim. Biophys. Acta.* 650, 88-127.
- 39) Pascual, C. and Kotyk, A. 1981. A Simple Spectrophotometric Method for Determining Proton Release from Yeast Cells. *Analytical Biochemistry*. 123, 201-204.
- 40) Sachs, G. et.al. 1976. A None Electrogenic  $H^+$  Pump in Plasma Membrane of Hog Stomach. *J. Biol. Chem.* 251, 7690-7698.
- 41) Borst Pauwels, G.W.F.H. et.al. 1983 All or none interactions of inhibitors of the plasma membrane ATPase with Saccharomyces cerevisiae *Biochim. Biophys. Acta.* 732:1, 186-192.
- 42) Foury, F. et.al. 1977. Efflux of Potassium Induced by Dio 9 a Plasma Membrane ATPase inhibitor in the Yeast Schizosaccharomyces pombe. *J. Biol. Chem.* 252, 4577-4583.
- 43) Scarborough, G.A. 1975. Isolation and Characterization of Neurospora crassa Plasma Membrane. *J. Biol. Chem.* 250, 1106-1111.
- 44) Scarborough, G.A. 1976. The Neurospora Plasma Membrane ATPase is an electrogenic pump. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 73:5, 1485-1488.
- 45) Perlin, D.S. et.al. 1984. Electrogenic  $H^+$  translocation by the plasma membrane ATPase of Neurospora. *J. Biol. Chem.* 259, 7884-7892.
- 46) Fuhrman, G.F. et.al. 1976. Sugar transport and potassium permeability in yeast plasma membrane vesicles. *Biochim. Biophys. Acta.* 433, 583-596.
- 47) Franzusoff, A.J. and Cirillo, V.P. 1983. Glucose transport activity in isolated plasma membrane vesicles from Saccharomyces cerevisiae. *J. Biol. Chem.* 258, 3608-3614.

3608-3614.

- 48) Vacata, V. et al. 1981. Membrane Potential in Yeast Cells Measured by Direct and Indirect Methods. *Biochim. Biophys. Acta.* 643, 265-268.
- 49) Boxman, A.W. et al. 1982. Some Characteristics of Tetraphenylphosphonium uptake into Saccharomyces cerevisiae. *Biochim. Biophys. Acta.* 686, 13-18.
- 50) De la Peña, P. et al. 1982. The Electrochemical Proton Gradient of Saccharomyces cerevisiae. The role of potassium. *Eur. J. Biochem.* 123, 447-453.
- 51) Waggoner, A.S. 1979. Dye Indicators of Membrane Potential. *Ann. Rev. Biophys. Bioeng.* 8, 47-68.
- 52) Bashford, C.L. and Smith, J.C. 1979. The Use of Optical Probes to Monitor Membrane Potential. *Methods in Enzymology.* 55, 569-586.
- 53) Peña, A. 1984. The Use of a Cyanine Dye in Measuring Membrane Potential in Yeast. *Arch. Biochem. Biophys.* 231:1, 217-225.
- 54) Geisow, M. et.al. 1981. Temporal changes of lysosomal and phagosome pH during phagolysosome formation in macrophages: Studies by fluorescence spectroscopy. *J. of Cell Biol.* 89, 645-652.
- 55) Galloway, C.J. 1983. Acidification of macrophage and fibroblast endocytic vesicles in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 80, 3334-3338.
- 56) Yamashiro, D.J. et.al. 1983. Acidification of endocytic vesicles by an ATP dependent proton pump. *J. of Cell. Biol.* 97, 929-934.
- 57) Slavik, J. 1982. Intracellular pH of yeast cells measured with fluorescent probes. *FEBS Letters.* 140:1, 22-26.
- 58) Theuvenet, A.P.R. et.al. 1983. 9-amino acridine, a fluorescent probe of the thiamine carrier in yeast cells. *Biochim. Biophys. Acta.* 730, 255-262.
- 59) García, M.L. et.al. 1984. Voltage-dependent proton fluxes in liposomes. *Biochim. Biophys. Acta.* 766, 109-115.
- 60) De Kloet, S.R. et.al. 1961. Studies on protein synthesis by protoplast of Saccharomyces carlsbergensis. *Biochem. Biophys. Acta.* 47, 130-146.
- 61) Lowry, O.H. et.al. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265-275.
- 62) Fiske, C.A. and Subbarow, Y. 1925. The colorimetric determination of phosphorus. *J. Biol. Chem.* 177, 751-766.
- 63) Smith, J.C. et al 1976 Synthesis, structure, determination, spectral properties and energy-linked spectral responses of the extrinsic probe Oxonol V in membranes. *Biochemistry.* 15, 5094-5105.
- 64) Smith, J.C. et.al. 1980. Kinetics of the association of potential sensitive

dyes with model and energy transducing membranes : Implications for fast probe response times. J. Membrane Biol. 54, 127-139.

65) Evans, E.H. and Crofts, A.R. 1974. The relationship between delayed fluorescence and the carotenoid shift in chromatophores from Rhodospseudomonas capsulata. Biochim. Biophys. Acta. 333, 44-51.

66) Ross, W.N. et al 1977. Changes in absorption, fluorescence, dichroism, and birefringence in stained giant axons: Optical measurement of membrane potential. J. Membrane Biol. 33, 141-183.

67) Sims, P.J. et al. 1974. Studies on the mechanism by which cyanine dyes measure membrane potential in blood cells and phosphatidylcholine vesicles. Biochemistry. 13, 3315-3330.