

CANALES IONICOS DE LEVADURAS INCORPORADOS EN BICAPAS LIPIDICAS PLANAS.

TESIS QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
DOCTOR EN INVESTIGACION BIOMEDICA BASICA  
(BIOQUIMICA)

presenta el  
M. en C. Froylán Miguel Gómez Lagunas.

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 esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

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

*INDICE*

<i>RESUMEN.....</i>	<i>0</i>
<i>INTRODUCCION.....</i>	<i>3</i>
<i>MATERIALES Y METODOS.....</i>	<i>25</i>
<i>RESULTADOS.....</i>	<i>30</i>
<i>DISCUSION Y CONCLUSIONES.....</i>	<i>75</i>
<i>PERSPECTIVAS.....</i>	<i>91</i>
<i>BIBLIOGRAFIA.....</i>	<i>92</i>
<i>APENDICE.....</i>	<i>109</i>

## RESUMEN

En este trabajo se demuestra, por primera vez, que los canales iónicos de levaduras pueden ser estudiados en bicapas lipídicas planas bajo fijación de voltaje.

Los canales registrados presentaron las siguientes características: (i) en la mayoría de los experimentos se incorporó más de un canal a las bicapas, lo cual sugiere que los canales se encuentran agrupados en racimos. El comportamiento cinético sugiere, además, que en los racimos la actividad de los canales no es independiente; (ii) con las soluciones iónicas empleadas (300 mM KCl *cis*/100 mM KCl *trans*), las dos conductancias menores registradas en bicapas de PE/PS::1/1, fueron de 40 y 65 pS, y parecen originarse por la actividad de dos canales diferentes; (iii) los canales registrados fueron permeables al  $K^+$ , con una relación de permeabilidades ( $P_{K^+}$ )/( $P_{Na^+}$ ) de 2; (iv) el  $Ba^{2+}$  y el TEA bloquearon a los canales; (v) tanto en bicapas con incorporación múltiple de canales, como en bicapas con un sólo canal, la actividad de éstos fue ligeramente dependiente del voltaje.

## SUMMARY

In this work we show that the fusion of purified plasma membranes of yeast into planar bilayers allows the study of yeast channels.

The properties of the recorded channels were: (i) in most cases more than one channel became incorporated in the bilayer, this behavior suggests that the channels are distributed in clusters in the yeast membrane. Furthermore, the kinetic behavior suggests that the channels do not gate independently; (ii) the main conductances detected were of 40 and 65 pS, and they seem to arise from the activity of two different channels; (iii) the recorded channels were permeable to  $K^+$ , with a ratio  $(P_{K^+})/(P_{Na^+})$  of 2; (iv) the channels were blocked by  $Ba^{2+}$  and TEA; (v) the channels were only slightly voltage dependent.

## INTRODUCCION

Las células de todos los seres vivos se encuentran delimitadas por membranas que, además de separar el interior celular del medio externo y dividir el interior en compartimentos, desempeñan una gran variedad de funciones centrales para la vida celular. Una de éstas funciones, tal vez la más importante, es la de constituir una barrera de permeabilidad selectiva tanto para la entrada como para la salida de materia de los compartimentos que delimitan.

Las bases estructurales de las membranas que dan lugar a sus propiedades de permeabilidad son: el interior hidrofóbico de la bicapa lipídica, que le confiere una permeabilidad basal y la presencia, característica para cada membrana, de proteínas que realizan funciones de transporte de manera selectiva [126].

### *PERMEABILIDAD BASAL DE LAS MEMBRANAS.*

El interior hidrofóbico de las membranas les confiere una permeabilidad basal no selectiva para moléculas no polares [38] y el agua [37], de acuerdo con la cual una sustancia "k" dada puede entrar o salir en forma pasiva ( $\Delta\mu < 0$ ) con un flujo neto "J" que, en estado estacionario, está dado por:

$$J = P_k (C_k^o - C_k^i)$$

La ecuación anterior (1ª ley de Fick de la difusión [127]), establece que dada una diferencia de concentraciones " $C_k$ " entre el exterior "o" y el interior "i" de un compartimento, el flujo neto

pasivo (de mayor a menor concentración) depende del valor de la permeabilidad basal " $P_k$ " de la membrana.

$P_k$  depende de la solubilidad de  $k$  en la membrana en relación con el agua " $\beta_k$ ", de su coeficiente de difusión en la membrana " $D_k$ ", y del grosor de la región hidrocarbonada de la membrana " $\Delta x$ ", de acuerdo con la expresión [38, 127]:

$$P_k = (D_k \beta_k) / \Delta x$$

$\Delta x$  es aproximadamente constante entre distintas membranas; así la permeabilidad basal varía directamente con el producto de  $D_k$  y  $\beta_k$  [38]. El coeficiente de difusión decrece con el volumen molar del compuesto [37].  $\beta_k$  varía exponencialmente con la diferencia de potencial químico estándar de  $k$  ( $\mu_k^\circ$ ) entre la fase acuosa y la membrana [127], de acuerdo con la siguiente expresión:

$$\beta_k = \exp(-[\mu_k^\circ(\text{membrana}) - \mu_k^\circ(\text{agua})] / RT)$$

Para compuestos no polares  $\Delta\mu^\circ$  es negativo; por ejemplo, en la serie de los alcanos,  $\Delta\mu^\circ$  es negativo y decrece linealmente con el número de átomos de carbono [130].

Así, entre moléculas de tamaño semejante, la permeabilidad basal crece exponencialmente con la hidrofobicidad del compuesto. Por otro lado, como el  $\Delta\mu^\circ$  de moléculas hidrofílicas como los iones, es positivo, la permeabilidad basal hacia éstos es muy baja, (e.g., se requiere de un aporte de energía de 250 KJ para transferir a un mol de  $K^+$  del agua al interior de una membrana [72]); por tanto, los flujos pasivos que tienen lugar debido a la permeabilidad basal de la membrana están restringidos, con excepción del agua, a moléculas no polares [37, 38, 127], y por ello la ecuación de Fick no toma en cuenta la existencia de

fuerzas eléctricas.

Los compuestos hidrofílicos, y en particular los iones, cruzan las membranas, prácticamente sólo a través de las rutas de permeabilidad selectiva (ver la 1ª y 2ª columnas de la tabla 1, donde se dan valores de permeabilidad basal de bicapas lipídicas hacia iones, en unidades de resistencia eléctrica).

#### *CANALES IONICOS Y ACARREADORES. ELEMENTOS ESTRUCTURALES DE LA PERMEABILIDAD SELECTIVA DE MEMBRANAS.*

El paso de sustancias hidrofílicas de un compartimento a otro se da a través de proteínas integrales características de cada membrana. Funcionalmente, las proteínas de transporte son de dos tipos a saber: acarreadores y canales. Un acarreador se puede definir como una proteína integral de membrana con función de transporte, en la cual el o los sitios de unión a sus sustratos están accesibles en forma alternada a ambos lados de la membrana, pero no simultáneamente; en tanto que en un canal los sitios son accesibles de manera simultánea en ambos lados de la membrana [76].

A diferencia del transporte basal, descrito por la ecuación de Fick, que es poco selectivo, el transporte por canales y acarreadores es altamente selectivo. Así, estas proteínas forman la base estructural de la permeabilidad selectiva de las membranas biológicas, que está dada por la naturaleza de las interacciones de las proteínas transportadoras con sus sustratos [53, 69].

Una gama muy amplia de sustratos, tanto hidrofílicos como



hidrofóbicos, pueden transportarse, de manera selectiva, por acarreadores. En los acarreadores, la selectividad suele medirse como la concentración a la que se obtiene la mitad de la velocidad máxima de transporte ( $K_m$ ) [69].

A través de los canales principalmente se mueven iones y agua. En condiciones fisiológicas, la mayoría de los canales catalizan el paso de  $K^+$ ,  $Na^+$ ,  $Ca^{2+}$  y  $Cl^-$  [51] --aunque su grado de selectividad es muy variable y algunos poco selectivos, como las porinas de las bacterias, permiten el paso de moléculas como la urea e incluso azúcares [15]--; muchos canales son capaces de seleccionar fuertemente entre iones de igual valencia, y cuyo radio cristalino difiere solo en décimas de angstrom (e.g., ver la tabla 1 de la referencia 72).

La selectividad de los canales iónicos se expresa en términos de coeficientes de permeabilidad, o comparando la conductancia del canal para sus distintos iones permeantes [34, 52, 53, 69, 72].

Los coeficientes de permeabilidad se calculan a partir de la ecuación de Goldman [34, 52]:

$$P_K = I_K (RT/F^2) \exp(V_m F/RT) / ([K]^o - [K]^i \exp(V_m F/RT))$$

En donde  $F$  es la constante de Faraday,  $R$  la constante de los gases,  $T$  es la temperatura absoluta,  $V_m$  es el potencial de membrana, y  $[K]$  es la actividad del  $K^+$ . En esta expresión,  $P_K$  está dado en la misma forma que en la ecuación de Fick, es decir:  $P_K = D_K \beta_K / \Delta x$ , solo que aquí los coeficientes de difusión y partición son los del ion en el poro acuoso que forma el canal (ver más abajo) [52].

Una de las hipótesis bajo las que se deriva la ecuación de

Goldman, es la que en 1952, Hodgkin y Huxley llamaron el principio de independencia [56]: La oportunidad (probabilidad) de que un ion dado cruce la membrana en un intervalo de tiempo dado, es independiente de la presencia de otros iones.

Sólo en los casos en que se cumple el principio de independencia, coinciden las medidas de selectividad en términos de conductancias, con aquellas dadas en términos de coeficientes de permeabilidad [13, 54].

Actualmente se sabe que el paso de iones a través de muchos tipos de canales no se comporta de acuerdo con el principio de independencia [13, 52, 54, 139]. Sin embargo, el cálculo de coeficientes de permeabilidad a partir de la ecuación de Goldman, constituye el punto de partida de todos los estudios de selectividad de los canales iónicos.

#### *CARACTERISTICAS GENERALES DEL TRANSPORTE POR ACARREADORES Y CANALES.*

Tanto los canales como los acarreadores son proteínas integrales de las membranas; ambos son enzimas, ya que catalizan (aceleran) el paso de iones y moléculas (sus sustratos) de un compartimento a otro, sin afectar el  $\Delta G$ . (el cambio de energía libre) del proceso [32, 88].

A diferencia de la difusión simple en que, según la ecuación de Fick, el flujo aumenta linealmente con la concentración, el flujo a través de acarreadores y canales varía en forma compleja con la concentración, dependiendo del tipo particular de

interacción de la proteína de transporte con los iones o moléculas que se transportan [54].

Dos características funcionales establecen la diferencia entre acarreadores y canales, la primera, de carácter energético, consiste en que a través de los canales los iones se mueven siempre a favor de su gradiente electroquímico ( $\Delta\mu < 0$ ) [52], en tanto que el transporte por acarreador puede ser a favor de gradiente o pasivo ( $\Delta\mu < 0$ ), o bien en contra de gradiente o activo ( $\Delta\mu > 0$ ) [127]. La segunda diferencia es de tipo cinético: el número de recambio de un canal es varios órdenes de magnitud mayor que el de un acarreador, y que el de la mayoría de las enzimas solubles [32, 88] (el número de recambio de una enzima se define como: el número de moles de sustrato transformados por minuto por mol de enzima bajo condiciones óptimas [124]). A través de un canal pueden pasar de  $10^6$  a  $10^9$  iones por segundo, lo que está muy por encima de la velocidad de un acarreador [88].

La baja velocidad de transporte a través de un acarreador hace que la corriente eléctrica asociada con este proceso sea muy pequeña; así, por ejemplo la bomba de  $\text{Na}^+ - \text{K}^+$  presenta una velocidad máxima de 540 iones  $\text{Na}^+$  y 360 iones  $\text{K}^+$  por segundo a  $37^\circ\text{C}$  [88], lo que produce un flujo saliente neto de hasta 180 cationes monovalentes por segundo, esto corresponde a una corriente de tan sólo  $1.8 \times 10^{-4}$  pA; este nivel de corriente, esta muy por debajo del ruido eléctrico de origen térmico que, a  $37^\circ\text{C}$ , en una resistencia de 1 M $\Omega$  es de 4 pA, a 1 KHz [128]. En contraste, la magnitud de la corriente asociada al flujo de iones por un canal es del orden de picoamperes, lo que permite el

registro de esta "corriente unitaria".

Un dato que permite comprender la diferencia en las velocidades de transporte entre acarreadores y canales, es el  $Q_{10}$  del proceso: el transporte por acarreador tiene un  $Q_{10}$  de 2 a 3, lo que señala que se tienen que remontar energías de activación elevadas; por otro lado, el  $Q_{10}$  para el flujo de iones a través de canales es del orden de 1.3 a 1.6, que es como el de la difusión de iones en agua [52, 88].

El  $Q_{10}$  del flujo por canales y su alta velocidad de transporte indican que, al abrirse, los canales forman un poro acuoso a través del cual los iones difunden [52, 88].

#### *MÉTODOS DE ESTUDIO DE LOS CANALES IONICOS*

##### *FIJACION DE VOLTAJE. FUNDAMENTO.*

El interior hidrofóbico de la bicapa lipídica, y la presencia en ésta de proteínas con función de transporte, hacen que la membrana se comporte como un capacitor en paralelo con una resistencia. Este comportamiento -modelo RC- fué señalado por Cole y Curtis en 1938 [52]; de esta forma la corriente de la membrana a un tiempo dado  $I(t)$  esta dada por dos componentes:

$$I(t) = I_c(t) + I_r(t)$$

$I_r$  es la corriente resistiva, y  $I_c$  es la corriente capacitiva.  $I_r$  es la suma de las corrientes iónicas que cruzan la membrana en un tiempo dado:

$$I_r(t) = \sum I_j(t)$$

$I_j$  es la corriente que transporta el ion  $j$ .  $I_c$  es la corriente formada por reacomodos de carga en y a través de la membrana [52];  $I_c$  esta dada por:

$$I_c(t) = C_m \cdot (dV/dt)$$

$C_m$  es la capacidad eléctrica (capacitancia) de la membrana y  $V$  es el potencial de membrana, de esta manera, la corriente de la membrana esta dada por:

$$I(t) = C_m \cdot (dV/dt) + \sum I_j(t)$$

Durante procesos fisiológicos como en un potencial de acción, o durante condiciones experimentales en las que se cambia el voltaje a una membrana, el potencial de membrana  $V$ , cambia decenas de milivolts en el orden de micro a milisegundos. Por ejemplo en el axón del calamar, *L. pealei*, el potencial de acción se produce con una velocidad máxima de 400 mV/ms [86]; debido a esto, la corriente capacitiva  $I_c$  es tan grande que enmascara a la corriente resistiva. Entonces, para poder registrar las corrientes iónicas que fluyen a través de la membrana, es necesario mantener fijo el voltaje, de manera que la derivada que aparece en  $I_c$  se anule.

La fijación de voltaje de una membrana, a través de la cual se están dando flujos iónicos netos, se logra mediante un circuito de retroalimentación negativa. El circuito continuamente reajusta la corriente, de manera que la membrana permanece a voltaje constante y se mide la corriente iónica. Cole y Marmont desarrollaron este procedimiento en 1949 y se le conoce como fijación de voltaje [52].

La implementación práctica de la fijación de voltaje depende del tipo de preparación con que se trabaje (e. g., ver capítulo 2

de la referencia 52); la que se emplea en bicapas planas se describirá en la sección de Materiales y Métodos.

La fijación de voltaje fue empleada por primera vez por Cole y por Hodgkin, Huxley y Katz en 1949 [52]. Posteriormente, en 1952, Hodgkin y Huxley emplearon la fijación de voltaje en su estudio clásico sobre las bases iónicas del potencial de acción en el axón gigante del calamar *Loligo pealei* [56- 59]. En dicho estudio registraron el curso temporal de la corriente iónica promedio (macroscópica) que pasa a través de la membrana del axón a distintos voltajes.

La estrategia experimental empleada por Hodgkin y Huxley y el modelo matemático que elaboraron, han sido, sin duda alguna, la mayor influencia en los estudios de las corrientes iónicas a través de canales, tanto a nivel macroscópico como a nivel unitario (de un solo canal) [86], aunque cabe señalar que Hodgkin y Huxley nunca emplearon el término de canales.

Desde los trabajos de Hodgkin y Huxley, se ha y se sigue obteniendo mucha información valiosa mediante el registro de la corriente promedio (macroscópica) que fluye a través de los canales de una membrana. Sin embargo, hay toda una serie de datos que no se pueden obtener fácilmente a partir de registros macroscópicos. Por ejemplo: la conductancia de cada canal, la constante de asociación de una droga con los canales, o las constantes de velocidad de las distintas transiciones de los canales etc. La estrategia que se siguió en un principio para la obtención de este tipo de información, fue el análisis de ruido de las corrientes macroscópicas [52, 128]. Este enfoque, aunque

fructífero, tiene el inconveniente de que proporciona datos que no se obtienen de manera directa, y son dependientes del modelo molecular que se proponga. Actualmente se han desarrollado varias estrategias que permiten el registro directo de la actividad de un solo canal (para una discusión extensa de las ventajas de los registros unitarios sobre los macroscópicos ver a Colquhoun 1981 [24], también ver [2, 28]).

Uno de los logros más importantes de las técnicas para detectar la actividad de un solo canal, es que dan la posibilidad de registrar canales de células y de organelos celulares que no son accesibles con las técnicas electrofisiológicas clásicas.

#### *MÉTODOS DE REGISTRO DE CANALES UNITARIOS.*

Actualmente hay dos métodos de registro de canales unitarios: la incorporación de canales en bicapas lipídicas planas bajo fijación de voltaje [30], y el patch-clamp [50].

Las corrientes iónicas a través de un solo canal se observaron por primera vez en los años 60s con la técnica de incorporación en bicapas planas.

#### *BICAPAS LIPÍDICAS PLANAS.*

Existen varios tipos de bicapas fosfolipídicas planas: bicapas negras (BLN), bicapas formadas por aposición de monocapas y bicapas en la punta del electrodo del patch-clamp [30, 36, 48, 90, 129].

Tanto las BLN como las formadas por aposición de monocapas o virtualmente libres de solvente (BLLS), se forman a través de un agujero circular de una pared de plástico o de teflón que separa a dos compartimentos que contienen una solución electrolítica dada.

Las BLN se forman pasando por el agujero de la partición, un pincel con una dispersión de lípidos en un solvente orgánico no volátil, que usualmente es un alcano de cadena larga, por ejemplo n-decano. Esta clase de bicapas por lo tanto contiene solvente orgánico [30, 140]. El método de formación de BLN se detalla en la sección de materiales y métodos.

Las BLLS, se forman por aposición de monocapas lipídicas que virtualmente no contienen solvente orgánico. Primero, la interfase aire-líquido de las soluciones electrolíticas se deja por debajo del agujero de la partición. Se pueden formar monocapas lipídicas de varias maneras en la interfase aire-líquido. Por ejemplo a partir de un equilibrio espontáneo con los fosfolípidos de vesículas de membranas biológicas o de liposomas que se adicionen a las soluciones electrolíticas, o bien mediante el depósito directo, en la interfase aire-solución, de una dispersión de lípidos en un solvente orgánico volátil como el hexano. Una vez que se han generado monocapas estables, se aumenta el nivel de las soluciones y, al coincidir las monocapas de la interfase en la apertura de la pared, se forma una bicapa [30, 90, 91, 120].

La tabla 1 (ref. 91) presenta las propiedades eléctricas de las bicapas lipídicas planas y de las membranas biológicas. Como puede observarse, desde el punto de vista eléctrico, las BLN y las BLLS difieren en el valor de su capacidad eléctrica; esto se debe



a las diferencias de grosor de ambos tipos de membranas. Las BLN, debido a la presencia del solvente orgánico, presentan un grosor mayor que las BLLS, y por lo tanto tienen una capacidad eléctrica específica menor. De la misma manera, al estar virtualmente libres de solvente, las BLLS tienen un grosor semejante al de las membranas biológicas, y por lo tanto su capacidad específica es similar. La resistencia eléctrica de las membranas biológicas es menor que la de las bicapas lipídicas planas debido a la presencia, en las membranas biológicas, de proteínas capaces de transportar iones.

Tabla 1. Propiedades de bicapas lipídicas (tomada de la ref 91)

Propiedad	BLN	BLLS	B. biológica.
Resistencia ( $\Omega \text{ cm}^2$ )	$10^6 - 10^8$	$10^6 - 10^8$	$< 10^6$
Capacidad ( $\mu\text{F}/\text{cm}^2$ )	$.45 \pm .05$	$.9 \pm .1$	.8- 1.2
Grosor de la región hidrocarbonada (A)*	42	22	16- 24

\*Grosor medido mediante el valor de capacidad...

La aposición de monocapas, se puede hacer en la punta de un electrodo para patch-clamp (ver abajo); en cuyo caso se obtienen BLLS en la punta del electrodo de patch [48, 129]. La aposición se logra cruzando más de una vez, con el electrodo, a una monocapa

lipídica preformada en la interfase aire-líquido de una solución electrolítica. La resistencia y capacidad específica de estas bicapas es igual a la de las BLLS; la diferencia está en que debido al área tan pequeña de la punta del electrodo, los valores totales de capacidad y resistencia de estas membranas son mucho menores que los de las BLLS, lo que finalmente se traduce en un nivel más bajo de ruido eléctrico [30, 48, 129].

Finalmente, cabe señalar que las bicapas lipídicas planas, también constituyen una herramienta para el estudio de bombas iónicas (e.g., referencia 51).

#### *INCORPORACION DE CANALES EN BICAPAS LIPIDICAS PLANAS. METODO DE FUSION.*

Los canales iónicos presentes en vesículas de membranas biológicas, o fracciones puras de canales reconstituidos en liposomas pueden incorporarse en bicapas lipídicas planas. La incorporación de los canales se puede obtener mediante la fusión de las membranas, que presentan los canales, con la bicapa plana [20, 22, 142].

Por convención, al lado de la bicapa al que se agregan las vesículas con los canales, se le denomina el lado *cis*, al lado opuesto se le denomina *trans*. El lado *cis* es también el lado al cual se aplica el voltaje; el lado *trans* se mantiene virtualmente a tierra [83].

Para que pueda haber fusión se requiere que: i) las vesículas de membrana se adhieran fuertemente a la bicapa plana; esta fase

se ha denominado estado de prefusión; ii) que haya un flujo neto de agua hacia el interior de las vesículas que están en estado de prefusión. El flujo de agua hacia el interior de las vesículas, hace que estas se hinchen y se fusionen con la bicapa plana [1, 20- 22].

Cuando se tiene un potencial de superficie negativo, tanto en las vesículas como en el lado *cis* de la bicapa, la adición de cationes divalentes al lado *cis* facilita la adhesión de las vesículas con la bicapa plana [20, 22]. La adhesión también se favorece manteniendo en agitación la solución del lado *cis*.

Para tener un flujo neto de agua hacia el interior de las vesículas se siguen los siguientes procedimientos: i) hacer el interior de las vesículas hiperosmótico, respecto a la solución electrolítica del lado *cis*; ii) hacer que el lado *cis* sea hiperosmótico respecto del *trans*; naturalmente que esto produce un flujo neto de agua de *trans* a *cis*, y de esta forma las vesículas, estrechamente adheridas a la bicapa, se hinchan y algunas de ellas, eventualmente, se fusionan; iii) combinar los dos procedimientos de arriba [1, 20, 22].

El flujo de agua hacia el interior de las vesículas es una fase indispensable del proceso de fusión. [20, 22, 142] (sin embargo para un dato en dirección contraria ver la referencia 73). En cambio, la presencia de cationes divalentes, con un potencial de superficie negativo en las membranas, no constituye una fase indispensable, aunque sí incrementa considerablemente la probabilidad de la fusión [20]; esto parece deberse a que el estado de prefusión se puede alcanzar de cualquier manera en forma

espontánea [1, 22].

Finalmente, cabe señalar que algunos factores geométricos como el tamaño promedio de las vesículas o el número de bicapas de cada liposoma no parecen ser parámetros relevantes en el proceso de fusión [20, 142].

## EL TRANSPORTE DE IONES Y EL POTENCIAL DE MEMBRANA EN LAS LEVADURAS.

El potencial de membrana de las levaduras es generado por la expulsión activa de  $H^+$  a través de la ATPasa de  $H^+$  [17, 122].

La existencia de bombas de protones en la membrana plasmática de levaduras fue postulada por Peña en 1972 [98]. Se sabía que al adicionar  $K^+$  al medio en que se encuentran las levaduras, se produce un aumento en la velocidad de fermentación y de respiración de las células. Peña demostró que el efecto del  $K^+$  se produce sólo cuando el pH del medio es ácido (alrededor de 4.0). También demostró que los mismos efectos metabólicos se pueden obtener poniendo a las células en un medio sin  $K^+$ , pero con un pH alcalino. Finalmente, demostró que el efecto sobre el metabolismo, tanto de la adición de  $K^+$  como del pH alcalino, se debe a que en ambos casos se produce un aumento en los niveles de ADP de las levaduras. Con base en estos resultados, postuló la existencia de una ATPasa de  $H^+$  en la membrana plasmática. Las ATPasas generan un gradiente electroquímico de  $H^+$ ; la entrada de  $K^+$  depolariza la membrana y disminuye así el  $\Delta\mu_{H^+}$  y por tanto aumenta la expulsión de  $H^+$  y la hidrólisis de ATP a pH 4; claramente, un pH alcalino en el medio produce también un incremento en el bombeo de  $H^+$  por la ATPasa de  $H^+$  [99, 100].

En la explicación dada por Peña, también se formuló la hipótesis de que la energía para la entrada de  $K^+$  está dada por el potencial de membrana, y que la entrada de  $K^+$  ocurre a través de un sistema de transporte distinto al de la ATPasa de  $H^+$  (ya que, en un medio con pH alcalino, puede haber expulsión de  $H^+$  sin que haya  $K^+$  en el medio) [98, 101].

La hipótesis de que el influjo de  $K^+$  ocurre por un transportador distinto a la bomba de  $H^+$ , ha recibido apoyo con el uso de compuestos, como las alquilguanidinas y el bromuro de etidio, que, a concentraciones bajas, inhiben la entrada de  $K^+$  sin que aparentemente se afecte el bombeo de  $H^+$  [102, 103]. Sin embargo, algunos experimentos realizados con ATPasas de  $H^+$  parcialmente purificadas y reconstituidas en liposomas, han mostrado que el bombeo de  $H^+$  está acoplado al flujo de  $K^+$  [136,

137], aunque este punto no ha sido plenamente demostrado, principalmente por la falta de una preparación suficientemente pura de la ATPasa.

#### EL POTENCIAL DE MEMBRANA DE LEVADURAS.

El potencial de membrana de las levaduras se ha tratado de estimar tanto en forma directa, con microelectrodos, como de manera indirecta, a través de la distribución de cationes lipofílicos marcados radiactivamente, o de moléculas fluorescentes.

La evaluación del potencial de membrana mediante la distribución en el equilibrio de iones radiactivos o de moléculas fluorescentes, presenta varios problemas, como son la posible distribución de los indicadores en compartimentos intracelulares, de los cuales el más importante parece ser la mitocondria [104], ya que la diferencia de potencial de la membrana vacuolar parece ser de tan solo 20 mV, positivo en el interior de la vacuola [17, 122]; otro de los problemas en este tipo de mediciones es la posibilidad de que los iones indicadores se unan a sitios inespecíficos de las células, como las proteínas, las membranas internas etc, lo que ocasiona que la actividad de los indicadores sea menor que la concentración medida.

Además de los problemas mencionados arriba, uno de los mayores inconvenientes en el empleo de cationes lipofílicos radiactivos, es que en la mayoría de las levaduras, el tiempo que toma a estos iones alcanzar el equilibrio es muy largo, por lo que el valor de  $V_m$  calculado no refleja las condiciones iniciales de las células. Así por ejemplo, en *Saccharomyces cerevisiae* se ha reportado que se requiere de hasta 3 horas para que el tetrafenilfosfonio ( $TPP^+$ ) alcance el equilibrio [17], y en *Endomyces magnusii*, aún después de 4 horas de incubación, el  $TPP^+$  no se alcanza a equilibrar [12]; sin embargo en algunas levaduras del género *Rhodotorula*, el tiempo de equilibrio tanto del  $TPP^+$ , como de aniones como el tiocianato ( $SNC^-$ ), es de solo 20 min [63].

Debido a los problemas mencionados arriba, las medidas de

potencial basadas en el empleo de iones lipofílicos radiactivos y fluorescentes, solo pueden considerarse como indicadores semicuantitativos del potencial ( $V_m$ ) de las levaduras [12, 17, 122].

La evaluación del potencial de membrana con microelectrodos se ha realizado sólo en las especies de levaduras de mayor tamaño. En *Saccharomyces cerevisiae* Dobbelmann *et. al* (registros no publicados, comentados por Bakker *et. al* [12]) encontraron que no se pueden registrar potenciales estables con microelectrodos.

La tabla 2 muestra algunos de los valores de potencial de membrana reportados. Según se aprecia, aunque con diferencias cuantitativas, el valor de  $V_m$  medido tanto con TPP<sup>+</sup> como con microelectrodos, varía marcadamente con la concentración externa de protones. En general la membrana se hiperpolariza al aumentar el pH del medio. Una excepción es *P. humboldtii* en donde  $V_m$  alcanza una hiperpolarización máxima a pH 6.0 [62]. Otro de los factores que determinan el valor de  $V_m$  es la concentración de K<sup>+</sup>. El aumento en la concentración de K<sup>+</sup> del medio depolariza la membrana [31, 62]. El efecto tanto del pH como del K<sup>+</sup> sobre  $V_m$ , son una manifestación de la elevada permeabilidad de la membrana de levaduras hacia estos iones; así, aunque con las reservas que imponen las dificultades metodológicas señaladas, en la tabla 2 se observa que los valores de  $V_m$  medidos con microelectrodos son del orden de magnitud del potencial de Nernst del K<sup>+</sup> (comparar los valores de la tabla 2 de éste trabajo, con la tabla I de la referencia 17).

#### EL TRANSPORTE DE POTASIO EN LAS LEVADURAS.

La entrada de K<sup>+</sup> a las levaduras presenta las siguientes características:

a) Se da a través de al menos dos tipos de acarreadores, uno de baja afinidad, con Km de 0.5 mM [6] (y que históricamente fue el primer sistema de transporte en el que se utilizó el formalismo de Michaelis-Menten [27]); y otro, descrito recientemente, de alta afinidad, con Km de 20  $\mu$ M [110].

- b) El sistema de baja afinidad presenta la siguiente secuencia de afinidad:  $K^+ > Rb^+ > Cs^+ > Na^+ > Li^+$  [6].
- c) La entrada de  $K^+$ , por el sistema de baja afinidad, es inhibida en forma competitiva por las alquilguanidinas y por el bromuro de etidio, sin que esto afecte al bombeo de  $H^+$  [101- 103]. Más aún, en *K. lactis*, algunas mutantes resistentes al bromuro de etidio, tienen disminuida su capacidad de transporte tanto del etidio como de  $K^+$  por el sistema de baja afinidad [18].
- d) Los dos sistemas de transporte difieren también en su sensibilidad a desacoplantes y a la temperatura [110, 111].
- e) Los dos sistemas de transporte se activan dependiendo de la concentración de  $K^+$  del medio, mediante un proceso que aparentemente no requiere síntesis de proteínas [110, 111]. Este punto pone de manifiesto un aspecto importante a tomar en cuenta en los estudios de transporte en levaduras, a saber: sus características dependen marcadamente de la composición del medio en que son puestas antes del experimento.
- f) Se piensa que la fuerza directriz para el influjo de  $K^+$  es el potencial de membrana [101], ya que desacoplantes, como el DNP, inhiben la entrada de  $K^+$  a concentraciones en las que el contenido de ATP no se ve afectado [101] y, a mayor potencial de membrana, mayor es la entrada de  $K^+$  [101]. Aunque generalmente se piensa en la entrada de  $K^+$  como dada a través de un uniportador, claramente las evidencias anteriores no pueden descartar la existencia de un cotransporte  $H^+ - K^+$ ; más aún, en otros hongos se ha demostrado la presencia de dicho cotransporte [112, 122].
- Como se señaló arriba, aunque los valores de potencial de membrana calculados de la distribución de cationes lipofílicos, resultan demasiado bajos para explicar el  $\Delta\mu_{K^+}$  [17], el  $V_m$  medido con microelectrodos es del orden de magnitud requerido, lo que sugiere que el  $K^+$  se encuentra distribuido pasivamente a través de la membrana plasmática.
- Cuando las células, en ausencia de sustratos metabólicos, son transferidas a un medio sin  $K^+$ , se observa un eflujo neto de  $K^+$  durante un periodo que va de segundos a minutos. Cuando las células se encuentran fermentando o respirando, todo el  $K^+$  que



salió es nuevamente acumulado. A diferencia del influjo de  $K^+$  que ha sido muy estudiado, es muy poco lo que se sabe de su eflujo.

Al menos una parte del eflujo pasivo que se observa al pasar a las levaduras a un medio sin  $K^+$ , debe darse a través canales iónicos, ya que, como se mencionó arriba, éstos catalizan flujos iónicos pasivos. Las levaduras presentan al menos dos clases de canales iónicos: de  $K^+$  y canales sensibles a presión poco selectivos.

### *LOS CANALES IONICOS DE LAS LEVADURAS.*

El registro de las corrientes iónicas a través de canales comenzó, sin que se empleara el término de canal, con el estudio de las bases iónicas de los potenciales de acción de células excitables, básicamente en neuronas y músculos [52]; posteriormente, con el advenimiento de técnicas de incorporación de canales en bicapas lipídicas planas y del patch-clamp, se ha hecho evidente que los canales iónicos también se encuentran en células no-excitables i.e., que no presentan potenciales de acción; así se ha demostrado la presencia de canales en la membrana plasmática de bacterias [15, 80, 143], de protozoarios [34], de hongos unicelulares, y de células vegetales [93, 94]; también se ha demostrado que en los animales la presencia de canales iónicos no se encuentra restringida a las células excitables, sino que se encuentran en todos los tipos celulares, jugando papeles centrales en procesos tan variados como la respuesta inmune [74] o la fecundación [29]; más aún, se sabe que también se encuentran canales en membranas de organelos como las vacuolas, las mitocondrias y el retículo endoplásmico [23, 118, 132, 138].

En las levaduras, a finales de 1986, haciendo patch-clamp a protoplastos, se reportó la existencia de canales de  $K^+$  en su membrana plasmática [46]. Empleando la misma técnica, posteriormente, se reportó que también presentan canales sensibles a presión poco selectivos [47]. Los canales iónicos de la membrana plasmática han sido ya incorporados a bicapas lipídicas negras

[43- 45]; con el empleo de esta última estrategia, también se ha reportado la presencia de canales en la membrana de la vacuola [131, 138].

Haciendo patch-clamp de protoplastos, se ha reportado que los canales de  $K^+$  de la membrana plasmática de las levaduras presentan las siguientes características [46]:

- a) La conductancia unitaria de la transición más pequeña es de 20-27 pS, en soluciones simétricas de KCl 120 mM a pH 7.2, a 20 °C.
- b) Al reemplazar a 100 mM de KCl por 100 mM de NaCl, se reduce un poco la conductancia unitaria, y el potencial de inversión (i.e., el valor de potencial en el que la corriente vale cero) se desplaza a 5 mV del nuevo potencial de Nernst del  $K^+$ , lo que significa que los canales seleccionan al  $K^+$  sobre el  $Na^+$ ; sin embargo, no se dio explícitamente el valor de la permeabilidad relativa de estos iones.
- c) En la configuración de "célula completa" se observan corrientes macroscópicas al depolarizar la membrana. Cuando la membrana es hiperpolarizada, también se observan corrientes pero estas son inestables y, por ello, no fueron caracterizadas.
- d) El TEA 20 mM, y el  $BaCl_2$  10 mM, aplicados al medio externo, bloquean la corriente activada por depolarización, lo cual es otra indicación de que la corriente es transportada por canales de  $K^+$  [7-10]. Este efecto se reportó, en el caso de la adición de TEA, sólo a nivel de corrientes macroscópicas i.e., el bloqueo no se caracterizó a nivel unitario. El bloqueo por bario solo fue mencionado.
- e) Aunque el efecto no se ha mostrado, se menciona que los canales de  $K^+$  se bloquean completamente con concentraciones altas de  $Cs^+$  (170 mM).
- f) Se mencionó que la adición de 10 mM de  $CaCl_2$  al medio externo, o variaciones en el  $Ca^{2+}$  interno entre 0.1  $\mu M$  y 10 mM no tuvieron ningún efecto, lo que sugiere que estos canales no son regulados por  $Ca^{2+}$ .
- g) Cuando en el modo de célula completa se aplican voltajes por arriba de 40 mV, la corriente macroscópica de un pico inicial se relaja, en el orden de segundos, a un estado en el que es posible

observar las transiciones individuales de los canales; este último estado alterna con periodos en los que todos los canales están "inactivados".

h) La corriente activada por depolarización fluctua muy rápidamente (presenta "flickering").

i) La mutación *pmal-105* produce células de *S. cerevisiae*, que presentan una reducción de un 65% en su actividad de ATPasa, variación en el pH óptimo de la enzima, en la  $K_m$  para el ATP, y disminución de la sensibilidad a la inhibición por vanadato; la mutación afecta a la ATPasa en una región localizada a 10 aminoácidos de su sitio de fosforilación. En estas mutantes los canales de  $K^+$  son activados por ATP, así al agregar ATP ( $10\mu M$ - $1mM$ ) se observa que "la región de voltaje de actividad intensa de los canales, se desplaza hacia voltajes menores a medida que la concentración de ATP del medio aumenta" [107]. El ATP  $1\text{ mM}$  desplaza la curva de probabilidad de apertura, en  $50\text{ mV}$ , hacia valores menores de potencial. Debido a lo difícil que resultó el poder analizar las transiciones de un sólo canal, la probabilidad de apertura se tuvo que calcular haciendo análisis de ruido, bajo la hipótesis de que los canales presentan 2 estados cerrados y uno abierto [107].

j) Los canales sensibles a ATP se activan tanto por depolarizaciones como por hiperpolarizaciones mayores a  $100\text{ mV}$  [107].

k) Los canales sensibles a ATP se bloquean con  $20\mu M$  de DCCD [107].

Los canales sensibles a presión presentan las siguientes propiedades [47]:

a) La conductancia de la transición más pequeña es de  $36\text{ pS}$  en  $\text{CsCl } 170\text{ mM}$  a pH de 7.2.

b) La secuencia de permeabilidad ( $P_{\text{ion}}/P_{\text{Cs}^+}$ ) para cationes monovalentes es:  $K^+ (1.09) > Rb^+ (0.91) > Na^+ (0.75) > Li^+ (0.42)$ .

c) La secuencia de permeabilidad ( $P_{\text{ion}}/P_{\text{Cs}^+}$ ) para cationes divalentes es:  $Ba^{2+} (0.76) > Ca^{2+} (0.54) > Mg^{2+} (0.46) > Co^{2+} (0.32)$ .

d) La secuencia de permeabilidad ( $P_{\text{ion}}/P_{\text{Cs}^+}$ ) para aniones es:

I (1.37) > Br<sup>-</sup> (1.09) > Cl<sup>-</sup> (0.63) > F<sup>-</sup> (0.57) > Glu<sup>-</sup> (0.07).

e) Los canales son bloqueados desde el interior por Gadolinio 10  $\mu$ M.

f) Los canales son regulados por la tensión de la membrana, más que por la presión, y presentan adaptación (desensibilización) en función del voltaje.

Los canales de la vacuola de *S. cerevisiae* tienen las siguientes características [131, 138]:

a) La conductancia unitaria es de 435 pS en soluciones simétricas de KCl 300 mM o con 300 mM de KCl en *cis* y 100 mM de KCl en *trans*, a pH 7.2.

b) La selectividad ( $P_{ion}/P_{K^+}$ ) de estos canales es:

Cs<sup>+</sup> (1.02) > Na<sup>+</sup> (0.78) > Li<sup>+</sup> (0.72).

c) La conductancia relativa de la corriente macroscópica muestra un máximo a -30 mV; es decir, a un valor que aproximadamente corresponde al potencial normal de la membrana vacuolar.

d) Los canales de la vacuola sólo se abren cuando hay Ca<sup>2+</sup>, en el orden de milimolar, en el lado que corresponde al citoplasma de las células.

Uno de los aspectos que llama la atención de los trabajos publicados sobre canales de levaduras, es lo difícil que ha resultado obtener registros de canales únicos. Esto se ha traducido en que, hasta ahora, no se ha podido estudiar en detalle ni la cinética, ni la farmacología, ni la dependencia del voltaje de estos canales (la única curva reportada de probabilidad de apertura en función del voltaje, se obtuvo con análisis de ruido [107]). Así no es exagerado decir que todavía nos encontramos en la fase inicial de la caracterización de sus propiedades biofísicas.

Por lo que se refiere al papel fisiológico que tienen los canales en los hongos en general, y en las levaduras en particular, cabe señalar que hasta antes de la aparición del primer reporte sobre los canales de levaduras hace 4 años [46],

todos los flujos de iones, y en particular del potasio, se interpretaron generalmente en función de la operación de permeasas para iones [17]; por lo que aún no se sabe cual es el papel fisiológico de los canales en este tipo de organismos.

Este trabajo representa el inicio del estudio de los canales de la membrana plasmática de levaduras, mediante un enfoque alternativo y complementario al del patch-clamp, mediante la incorporación de los canales a bicapas lipídicas negras [43- 45].

Tabla 2. Potencial de membrana plásmática de levaduras.\*

especie	metodo de medida	[K <sub>o</sub> ] (mM)	pH	mv	# ref
<i>E. magnusii</i>	microelectrodos	0.1	4.5	-190	12
		0.1	7.0	-275	
	TPP <sup>+</sup>	0.1	4.5	-65	
		0.1	7.0	-125	
<i>P. humboldtii</i>	microelectrodos	0.1	4.0	-39	62
		0.1	6.0	-51	
		0.1	8.0	-30	
<i>R. gracilis</i>	TPP <sup>+</sup>	0.0	4.5	>-10	63
			6.5	-95	
			8.0	-156	
<i>S. cerevisiae</i>	TPP <sup>+</sup>	0.0	4.5	-56	17
		0.0	7.0	-82	
		200.0	4.5	-35	

\* Ver también la tabla I de la referencia 17.

## MATERIALES Y METODOS

Para los experimentos con bicapas planas, se trabajó con la cepa silvestre de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, XT300.3A, y con la cepa mutante PC-1, una mutante deficiente en el transporte de  $K^+$  de alta afinidad [108]. Para medir el transporte de aminoácidos, se trabajó con la cepa XT300.3A y con levadura obtenida comercialmente (La Azteca S. A., México D. F.).

Los reactivos utilizados son de grado analítico. Todas las soluciones empleadas en los experimentos con bicapas, se prepararon con agua bidestilada y desionizada, y se filtraron a través de filtros de  $.22 \mu\text{m}$  (Millipore/Continental Water Systems, Bedford, MA). Las bicapas planas se formaron con lípidos puros obtenidos comercialmente (Avanti Polar Lipids, Birmingham, AL).

### PREPARACION DE LOS ELECTRODOS

Se emplearon electrodos de plata/cloruro de plata. Los electrodos se hicieron de alambre de plata (Goodfellow Metals) de 1 mm de diámetro y alrededor de 5 cm de largo. El alambre de plata se colocó durante un mínimo de dos horas en una solución saturada de hipoclorito de calcio (Cloralex, México, D.F.). Una vez clorurados, los electrodos se colocaron en una punta para pipeta Gilson de 200  $\mu\text{l}$ , con Agar al 4% (w/v) en KCl 1M.

### PREPARACION DE MEMBRANA PLASMATICA DE LEVADURAS

La membrana plasmática de las levaduras se obtuvo mediante modificaciones del método de Franzusoff y Cirillo [40], previamente implementado en nuestro laboratorio [19] (la única diferencia es que la fase de sonicación se eliminó por los resultados mostrados en la referencia 97). Con el objeto de tener un gradiente osmótico adecuado para la fusión con la bicapa plana, los fragmentos de membrana plasmática, se sonicaron durante 2 min a 0 °C con Sacarosa 700 mM (concentración final) [20, 22, 142]. La preparación de membranas en sacarosa se dividió en alícuotas de 25  $\mu$ l y se mantuvo a -70 °C hasta el momento de usarse; las preparaciones empleadas nunca tuvieron más de 5 meses de estar congeladas, durante ese intervalo de tiempo, no se observó ninguna diferencia entre las alícuotas de membranas.

#### *FORMACION DE BICAPAS LIPIDICAS PLANAS.*

Las bicapas lipídicas negras se formaron con una mezcla uno a uno de fosfatidiletanolamina (PE) y fosfatidilserina (PS), o con el lipido sintético neutro, difitancoilfosfatidilcolina (DiphyPC), dispersos en n-decano a una concentración de 20 mg/ml [95].

Las bicapas planas se formaron sobre el agujero de un plástico (Saran Wrap, Dow Chemical Co., Indianapolis, IA). Se emplearon agujeros con un diámetro entre 200 y 300  $\mu$ m. Los agujeros se formaron mediante el paso de una chispa generada por una bobina de automóvil al conectarse a una batería de 12 V, de acuerdo con lo descrito por Hartshorn *et al* [49]. Una vez hecho el agujero, el plástico se colocó separando a dos compartimentos de Teflon de 400

$\mu$ l cada uno.

Previamente a la formación de cada bicapa, la caja de teflón, con su plástico ya instalado, se lavó con distintos solventes, en el siguiente orden: agua desionizada, etanol, metanol, cloroformo/metanol: 1/1, cloroformo, acetona y hexano. Después de lavada la cámara, la dispersión de lípidos se aplicó sobre el agujero del plástico, con un pincel de pelo de camello (# 0), y se pasó una corriente de  $N_2$  durante 3 min para PE/PS o 5 min para DiphyPC, a esta fase se le conoce como pretratamiento [49].

Después del pretratamiento, se procedió a colocar las soluciones de trabajo en los compartimentos de la cámara. A menos que otra cosa se indique, la solución del lado *trans* fue: 100 mM KCL, 0.1 mM  $CaCl_2$ , 10 mM HEPES-KOH pH 8.0; la solución del lado *cis* fue la misma, excepto que la concentración de KCl fue de 300 mM.

Una vez que se aplicaron las soluciones electrolíticas en ambos compartimentos de la cámara, ésta se conectó al sistema eléctrico de registro mediante los electrodos, y se aplicó la dispersión de lípidos sobre el agujero del plástico, con un capilar de vidrio al que previamente se le redondeó la punta con fuego. La formación de la bicapa se monitoreó midiendo su capacidad eléctrica, a partir de la corriente capacitiva generada mediante la aplicación de un pulso cuadrado de 1 mV (ver tabla 1), mediante la ecuación [91]:

$$C_m = (1/\Delta V) \int I_c dt$$

$I_c$  es la corriente capacitiva y  $\Delta V$  es el voltaje aplicado (1



mV).

Una vez formada la bicapa, ésta se dejó sin perturbar durante 10 min. Pasado ese tiempo se aplicaron pulsos de  $\pm 100$  mV durante 30 segundos. Se emplearon sólo aquellas bicapas que no mostraron cambios en su resistencia durante la aplicación de los pulsos. Una vez hecho esto, se procedió a agregar las membranas en el lado *cis* de la bicapa.

Usualmente se obtuvo incorporación de canales en aproximadamente el 30% de las bicapas, y esta ocurrió entre 1 y 120 minutos después de la primera adición de membranas. En cada adición se agregó 4  $\mu$ g de proteína. Generalmente se efectuó un máximo de 3 adiciones de membranas.

#### SISTEMA DE REGISTRO

El sistema de registro consistió de [3, 4]: un generador de pulsos conectado al electrodo del lado *cis* y un transductor corriente-voltaje (OPA 111A, Burr-Brown) conectado al electrodo de *trans*. La ganancia del transductor es de  $10^{10}$  (i.e 10 mV/pA). La salida del transductor se conectó a un acelerador de frecuencias altas (high frequency booster). La salida del "booster" se conecta simultáneamente, a la entrada de un osciloscopio (Hitachi V-222) y a un procesador digital de audio modificado (PCM-1 Digital VCR-Instrumentation Recorder Adaptor, Medical Systems Corp. Greenvale N.Y) con el que se grabó la señal en video-cassettes  $\beta$  (Video Cassette Recorder SL-S380, SONY) [16].

Para su análisis, los registros se filtraron (a menos que otra

cosa se indique) a 800 Hz (punto a -3 db) con un filtro Bessel de 8 polos (744PL-3, Frequency Devices Inc. Haverhill, MA), y se digitalizaron (a menos que otra cosa se indique) tomando un punto cada 500  $\mu$ s. El análisis se efectuó con el programa p-clamp 4.5 y S.S. En la construcción de los histogramas de amplitud, las transiciones con duración al pico menor a 1 ms fueron descartadas. Los histogramas de corriente, y la impresión de algunas de las figuras se hicieron con el programa "Canal" [75].

El generador de pulsos, el transductor corriente-voltaje y el acelerador de frecuencias altas que se emplearon en la mayoría de los experimentos, fueron construidos como parte de este trabajo. Hacia el final del proyecto también se armó un filtro, al que se adicionó una ganancia variable y un "offset". La última parte del trabajo se realizó con un amplificador Dagan modelo 3900, con el módulo de expansión 3910.

## RESULTADOS

### CARACTERISTICAS GENERALES DE PERMEACION DE LOS CANALES DE LEVADURAS EN BICAPAS LIPIDICAS NEGRAS.

En la figura 1A, se muestran las fluctuaciones de corriente producidas por la apertura y cierre de los canales de la membrana plasmática de levaduras incorporados en una bicapa PE/PS a +40 mV (positivo en *cis* con respecto a *trans*). En la figura puede observarse que existe más de un nivel de corriente correspondiente a la apertura de los canales, por lo que el histograma de amplitud de corriente de la figura 1B, muestra varios máximos. La presencia de varios niveles de corriente parece deberse a la incorporación de varios canales, más que a la existencia de distintos subestados de apertura de un solo canal (ver más abajo). Esta incorporación masiva de canales se obtuvo tanto con membranas de la cepa silvestre, como con la cepa mutante PC1, y se presentó aún en las bicapas en las que se procedió a disipar el gradiente osmótico, y por lo tanto a detener la fusión [20-22, 142] inmediatamente después de que se manifestó la incorporación de canales.

Los canales de ambas cepas son permeables al  $K^+$ ; esta conclusión se desprende de dos observaciones: a) a 0 mV la corriente corresponde al paso de cationes de *cis* a *trans* (ver fig 3), y dado que hay un gradiente de 3 a 1 de KCl en *cis* respecto de *trans*, el ion que esta transportando esa corriente es el  $K^+$ ; b) como se muestra en las tablas 1 y 2, el potencial de inversión de

Figura 1. Corrientes iónicas a través de canales de levaduras. (A) Fluctuaciones de corriente producidas por la apertura y cierre de canales de la cepa silvestre XT300.3A, incorporados en una bicapa formada a partir de la mezcla PE/PS:1/1. Las soluciones de trabajo fueron en milimolar: *cis.* 300 KCl, .1 CaCl<sub>2</sub>, 10 Hepes-KOH pH 8.0. *trans:* 100 KCl, .1 CaCl<sub>2</sub>, 10 Hepes-KOH pH 8.0. Las líneas punteadas corresponden al nivel cero de corriente. (B) Histograma de amplitud de corriente del experimento mostrado en A, los números son los valores de conductancia correspondientes a los picos de corriente en el histograma.

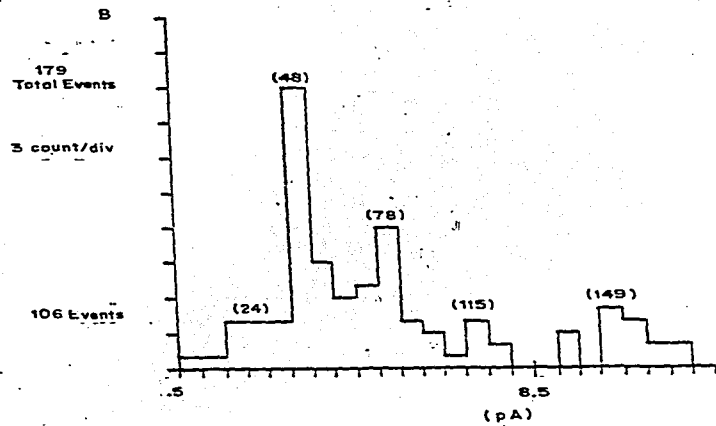
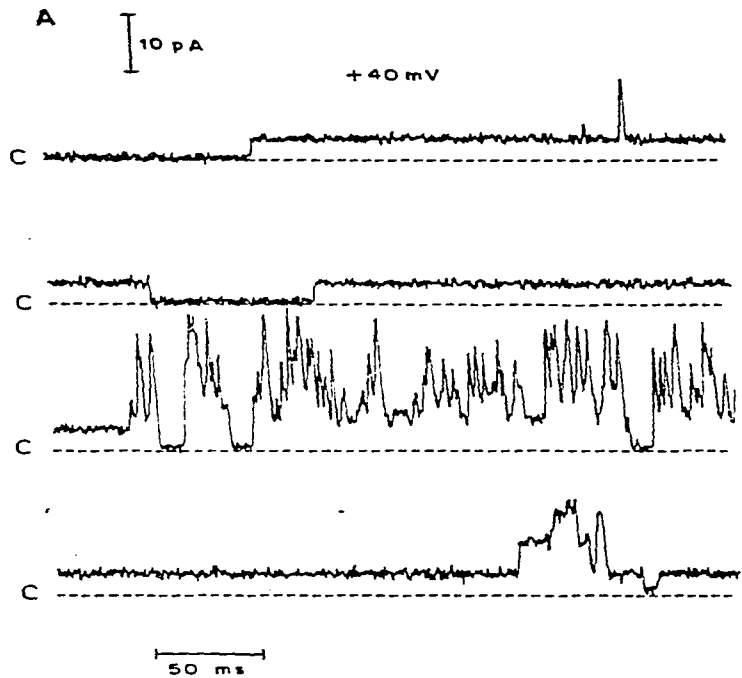


Tabla 1. Información estadística de los registros de canales de la cepa silvestre Xt300.3a. Los potenciales de inversión ( $E_{rev}$ ) de cada conductancia ( $\gamma$ ), se midieron con un gradiente 3:1 de KCl en las bicapas PE/PS, y en KCl simétrico en las bicapas DiphyPC.

Bicapas PE/PS :1/1			Bicapas DiphyPC.		
$\gamma$ (pS)	$E_{rev}$ (mV)	% bicapas	$\gamma$ (pS)	$E_{rev}$ (mV)	% bicapas
$41 \pm 9.9$	$-22.6 \pm 0$	30.0	$65.0 \pm 4.0$	$-0.8 \pm 3.7$	60.0
$65.3 \pm 4.0$	$-21.4 \pm 4.6$	71.0	$100.0 \pm 9.3$	$-1.3 \pm 1.6$	80.0
$112 \pm 6.5$	$-21.8 \pm 1.3$	57.1	$156.0 \pm 8.5$	$0.9 \pm 0.5$	29.0
$327 \pm 19.0$	$-16.0 \pm 9.1$	29.0			

Tabla 2. Conductancia y potenciales de inversión, de las corrientes iónicas más pequeñas, de canales de la cepa PC1. Los valores de conductancia, se obtuvieron de la pendiente de la gráfica I-V correspondiente. Las condiciones experimentales son las mismas de la fig 1, excepto que se trabajó con membranas de la cepa PC1. El potencial de Nernst del  $K^+$  es de -27.5 mV.

bicapa	$\gamma$ (pS)	$E_{rev}$ (mV)
1	72.1*	-17.0
2	69.3*	-16.0
3	57.5*	-38.0
promedio $\pm$ s	63.1 $\pm$ 10.8	-24.0 $\pm$ 10.1

\*Las corrientes se midieron a mano, tomándose el promedio de por lo menos 5 valores para cada punto de la curva I-V correspondiente. \*Los valores de corriente se calcularon de los picos de los histogramas de amplitud, obtenidos con el pclamp 405.

las distintas conductancias es muy cercano al potencial de Nernst para el  $K^+$ ; las diferencias observadas pueden deberse a variaciones en la concentración real de  $K^+$ , producidas durante el tiempo de formación de las bicapas, como lo demuestra el que las desviaciones no son sistemáticas, como sería de esperarse si los canales fueran también permeables a otro de los iones presentes.

En la tabla 1 se dan los valores de conductancia encontrados con mayor frecuencia en bicapas con carga negativa neta (PE/PS) y en bicapas formadas con el lípido neutro DiphyPC, a las que se fusionaron membranas de levaduras de la cepa XT300.3A. Los valores de conductancia se obtuvieron de la pendiente de curvas I-V de por lo menos 5 bicapas, los puntos de cada curva I-V fueron el promedio de al menos 5 valores.

Aunque en la tabla 1 las conductancias mayores a 65 pS aparecen como las más frecuentes, esto parece deberse a que en la mayoría de las bicapas se incorporó más de un canal, de 40 o 65 pS o ambos, y la suma de la corriente que pasa por todos ellos da lugar a las conductancias mayores a 65 pS (ver más abajo).

La figura 2 muestra las curvas I-V correspondientes a las dos conductancias menores y más comunes hasta ahora incorporadas, empleando membranas de la cepa XT300.3A i.e., 40 y 65 pS (ver tabla 1). En la figura 2 aparecen graficados valores obtenidos de 6 bicapas (aunque prácticamente, en la mayoría de las bicapas se han encontrado una u otra o ambas conductancias), por lo que se tienen valores de corriente tanto a voltajes positivos como a negativos. Sin embargo, en muchas bicapas, los canales sólo se abrían al aplicar voltajes positivos en cis, y en una ocasión, en



Figura 2. Curvas I-V de los dos niveles de apertura más pequeños y comunes, encontrados en la cepa XT300.3A. Las condiciones experimentales son como en la figura 1. La curva de los canales de 64 pS, se obtuvo del promedio de los datos de 6 bicapas, la de los canales de 40 pS, se obtuvo del promedio de 4 bicapas; en cada bicapa se midieron por lo menos 5 valores de corriente a cada voltaje, para cada una de las dos conductancias. La desviación estandar es menor del 10% en cada punto.

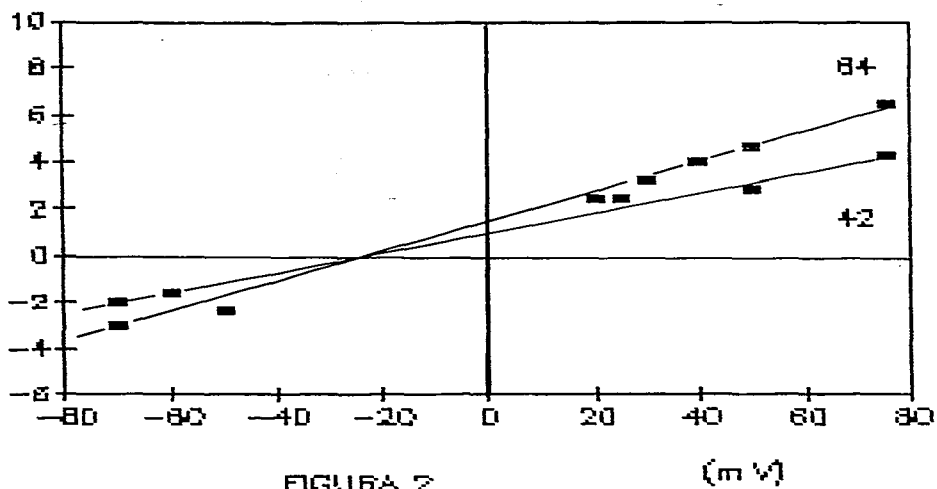


FIGURA 2

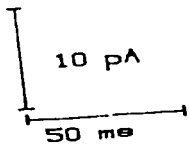
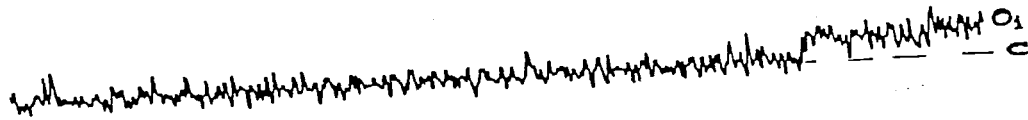
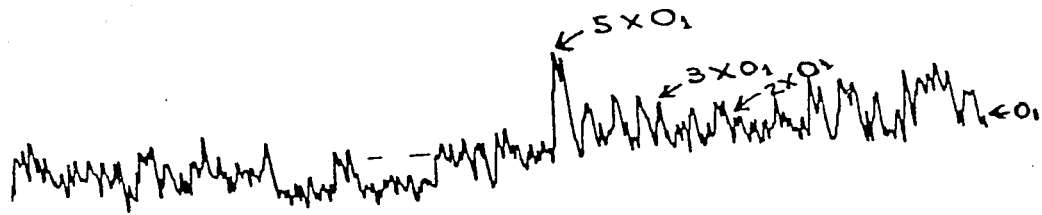
(mV)

que se incorporó un solo canal catiónico de 40 pS, éste sólo se abría a voltajes negativos. Esta asimetría en la respuesta al voltaje es congruente con los resultados reportados con patch-clamp en donde sólo se ven corrientes al depolarizar la membrana [46]. Probablemente las bicapas en las que se observaron aperturas tanto a voltajes positivos como a negativos, tenían canales incorporados en forma alternada. Los datos obtenidos en éstos experimentos nos permitieron tener una mejor estimación del potencial de inversión de las corrientes (fig 2).

En la tabla 2 se muestran los valores de conductancia y los potenciales de inversión de las aperturas de menor amplitud de los canales de la cepa PC1 [108]. Según puede apreciarse la conductancia menor corresponde a canales permeables a  $K^+$  (ver también arriba) de 65 pS; más aún, en una ocasión todos los niveles de corriente eran aproximadamente múltiplos del nivel con conductancia de 65 pS, según se muestra en la figura 3. Como en algunas ocasiones observamos transiciones de canal unitario (ver más abajo), y en éstas no se observó más de un nivel de corriente de 65 pS, el experimento de la figura 3 sugiere que la presencia de niveles múltiples de conductancia se debe a la incorporación de más de un canal a las bicapas, y no a la existencia de varios subestados de apertura de un solo canal.

Hasta ahora, con la cepa PC1, no se ha observado actividad cuya curva I-V tenga una pendiente de 40 pS. Esto bien puede deberse a que con esta cepa se han hecho mucho menos experimentos. De cualquier modo, con la información que tenemos hasta éste momento, esa es la mayor diferencia que hemos encontrado entre las

Figura 3. Aperturas de canales de la cepa PC1.a 0 mV. Note como todas las aperturas son aproximadamente múltiplos del nivel de corriente de 2 pA (72 pS), lo cual sugiere que los niveles de corriente mayores a 2 pA corresponden a la suma de la actividad de varios canales de 72 pS, y no a distintos subestados de apertura de un sólo canal. Condiciones experimentales como en la figura 1.



$0. \sim 63 \text{ pS}$

dos cepas.

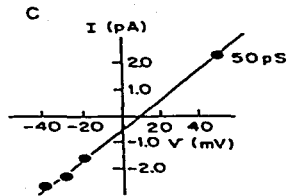
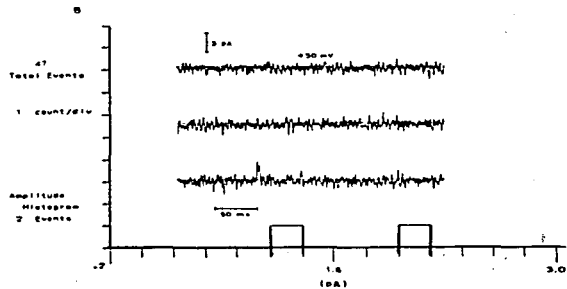
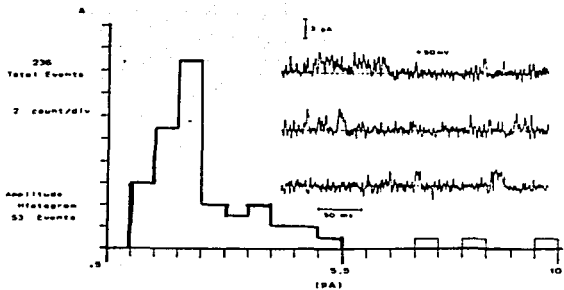
Con el objeto de obtener mayor información acerca de la selectividad de los canales, se trató de determinar la relación de permeabilidad del  $\text{Na}^+$  al  $\text{K}^+$ , en experimentos biiónicos con canales incorporados en bicapas lipídicas neutras (DiphyPC). En estos experimentos aún cuando la bicapa se formó con lípidos neutros, se mantuvo el  $\text{CaCl}_2$  100  $\mu\text{M}$  en las soluciones de ambos compartimentos, pues existen evidencias de que los canales de  $\text{K}^+$  requieren de cationes divalentes para poderse cerrar y mantener su selectividad [11].

En los experimentos biiónicos, con el objeto de identificar a alguna de las conductancias más comunes (tabla 1), primero se tomó una curva I-V control con soluciones simétricas de KCl 300 mM, y luego se procedió a cambiar la solución de *cis* por el mismo buffer que en *trans* solo que con 300 mM de NaCl en vez de KCl. En condiciones biionicas, se tomó otra curva I-V. Como al realizar estos experimentos siempre se tuvo a más de un canal en la bicapa, se supuso que los canales no rectifican al reemplazar al  $\text{K}^+$  por el  $\text{Na}^+$ , y su permeabilidad relativa se obtuvo del potencial de inversión ( $E_{\text{rev}}$ ) de las curvas I-V, en condiciones biiónicas, que tenían una conductancia semejante a la de las curvas control;  $E_{\text{rev}}$  se obtuvo mediante la forma correspondiente de la ecuación de Goldman:

$$\frac{(P_{\text{K}})}{(P_{\text{Na}})} = \frac{[\text{Na}^+]_{\text{cis}}}{([\text{K}^+]_{\text{trans}})} \exp(F E_{\text{rev}}/RT)$$

En la figura 4 C, se muestra la curva I-V en condiciones biiónicas, obtenida del promedio de 3 bicapas, la pendiente de la recta es de 51 pS y es así representativa de la conductancia de 65

Figura 4. Corrientes iónicas de canales de la cepa silvestre en condiciones biiónicas. Las condiciones experimentales son: *cis*: 300 mM NaCl, .1 mM CaCl<sub>2</sub>, 10 mM Hepes- NaOH pH 8.0; *trans*: 264 mM KCl, .1 mM CaCl<sub>2</sub>, 10 mM Hepes-KOH pH 8.0. (A) Histograma de amplitud de corriente en el control con KCl 300 mM en *cis* (ver el texto). (B) Histograma de amplitud después de reemplazar el KCl de *cis* por NaCl, nótese la reducción en el número de aperturas (ver Discusión). (C) curva I-V de 3 bicapas como en B, el potencial de inversión es de 11 mV, lo que da:  $(P_k)/(P_{Na}) = 2$ .





pS presente en los controles. El potencial de inversión calculado fué de 11 mV, lo que da:  $(P_K)/(P_{Na}) = 2$ , para los canales de 65 pS.

Los resultados discutidos arriba demuestran que los canales de la membrana plasmática de levaduras incorporados en bicapas lipídicas negras, son permeables al  $K^+$ , y los que en nuestras condiciones iónicas control, tienen una conductancia de 65 pS seleccionan al  $K^+$  sobre el  $Na^+$ . Este resultado es congruente con la elevada permeabilidad al potasio que presentan las levaduras [17].

#### *EFFECTO DE BLOQUEADORES DE CANALES DE POTASIO SOBRE LOS CANALES DE LEVADURAS.*

Dado que los canales incorporados a las bicapas son permeables al  $K^+$ , para recabar más información acerca de sus propiedades, se procedió a agregar los bloqueadores de canales de  $K^+$ , TEA (tetraetilamonio) y  $Ba^{2+}$  [7- 10, 52, 114].

La figura 5 muestra que la adición de  $BaCl_2$ , a una bicapas con muchos canales, resultó en una marcada disminución en los niveles de corriente a 40 mV; un efecto similar se observó en todos los voltajes, ésto se demuestra en la figura 6, en la que se que se grafica el nivel máximo de corriente a cada voltaje antes y después de la adición de  $BaCl_2$ . Un efecto similar al mostrado en las figuras 5 y 6 se observó en 5 experimentos.

La figura 7 muestra que la adición de TEA a bicapas con muchos canales produjo sólo una ligera reducción en los niveles de

Figura 5. Efecto del  $Ba^{2+}$  sobre los canales de levaduras. (A) Tiempo de permanencia de los niveles de corriente presentes en el control a 40 mV. La presencia de varios niveles de corriente obedece a la incorporación múltiple de canales a la bicapa. (B) Tiempo de permanencia de los niveles de corriente a 40 mV, después de la adición de 40 mM de  $BaCl_2$  a ambos lados de la bicapa. Notese la disminución en la corriente producida por la adición de  $Ba^{2+}$ .

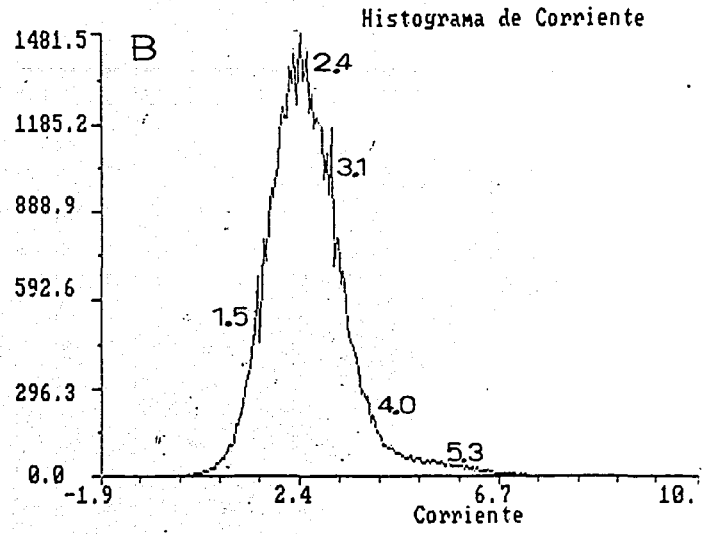
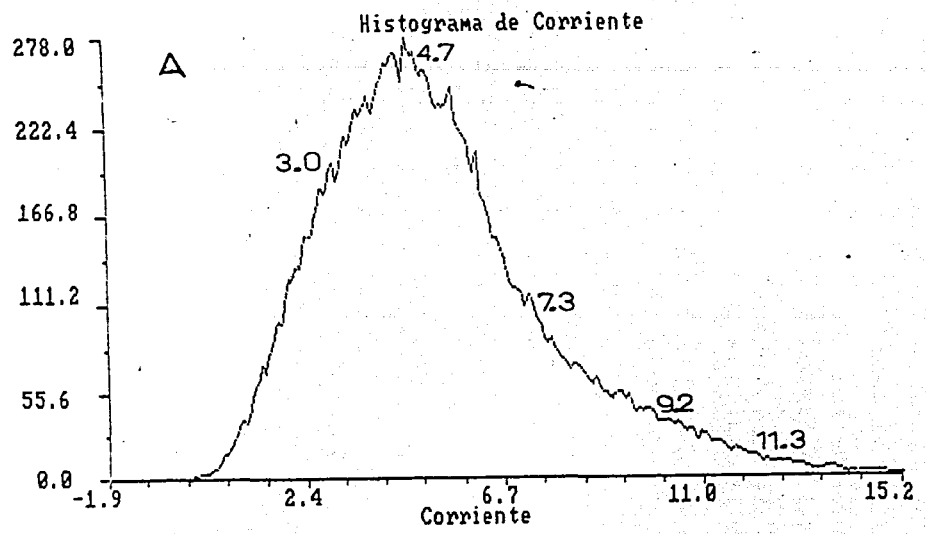


Figura 6. Bloqueo de los canales de levaduras por  $Ba^{2+}$ . Curvas de la corriente máxima en función del voltaje del experimento de la figura 5. La corriente máxima a cada voltaje se obtuvo de histogramas como los de la figura 5. Notese la disminución en la corriente producida por la adición de  $Ba^{2+}$ . Un efecto similar se observó en 5 experimentos.

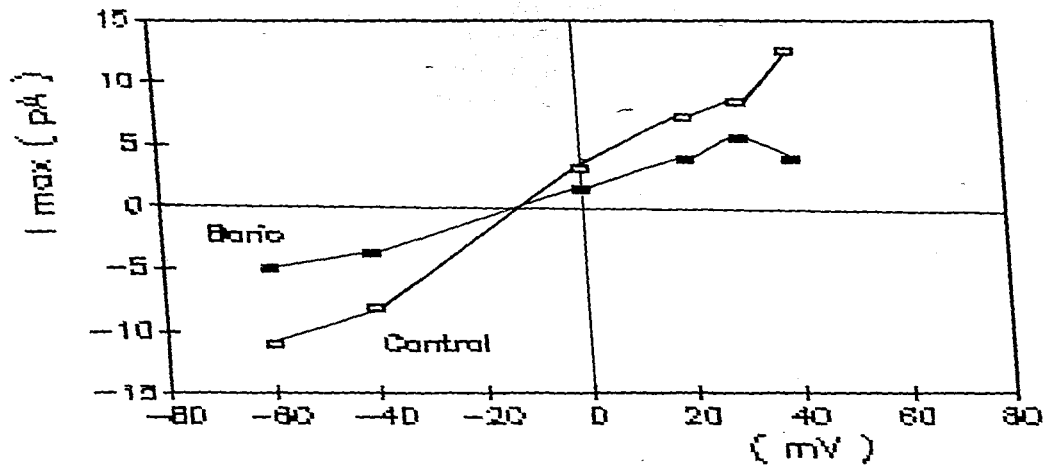


Figura 7. Efecto del TEA sobre los canales de levaduras. (A) Tiempo de permanencia de los niveles de corriente en el control a 40 mV. La presencia de varios niveles de corriente obedece a la incorporación múltiple de canales a la bicapa. (B) Tiempo de permanencia de los niveles de corriente a 40 mV, después de la adición de 20 mM de TEA a ambos lados de la bicapa. Notese la disminución en la corriente producida por la adición de TEA. Un efecto similar se observó en 3 experimentos.

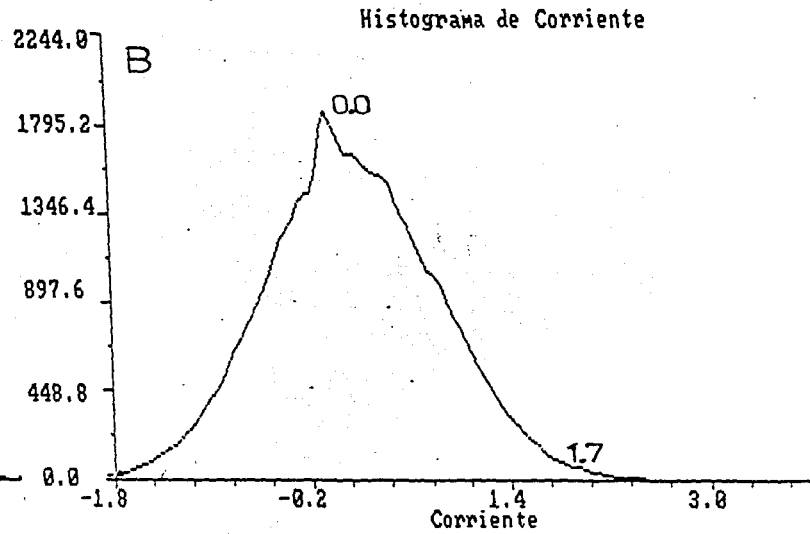
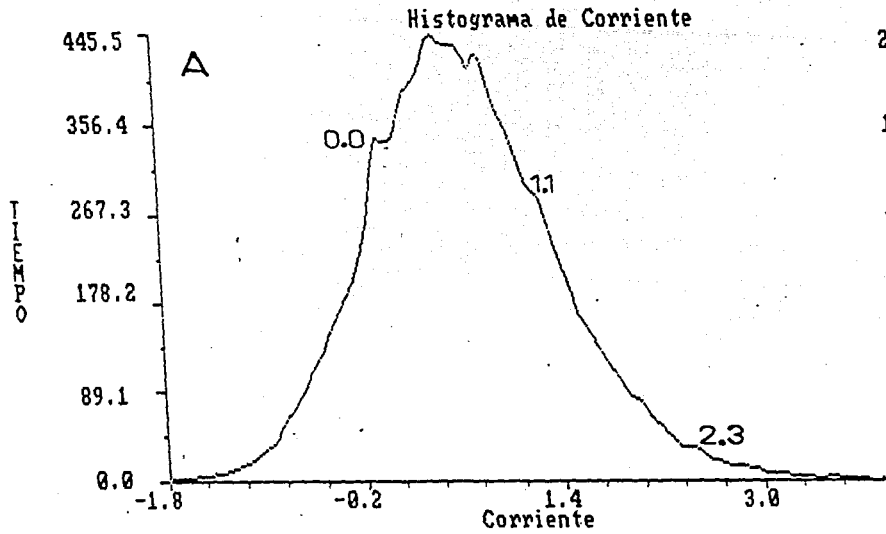
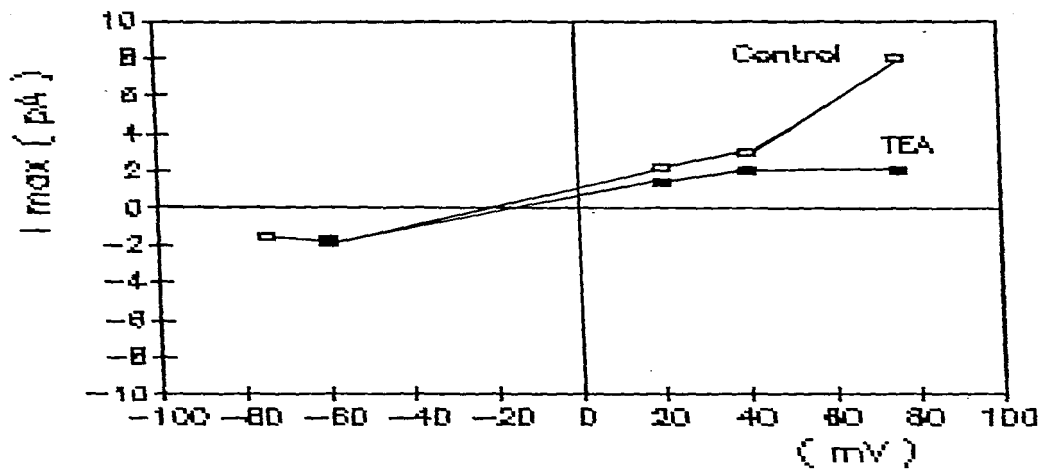


Figura 8. Bloqueo de los canales de levaduras por TEA. Curvas de la corriente máxima en función del voltaje del experimento de la figura 7. La corriente máxima a cada voltaje se obtuvo de histogramas como los de la figura 7. Nótese la disminución en la corriente producida por el TEA. Un efecto similar se obtuvo en 3 experimentos.





corriente a 40 mV; un efecto similar se observó en todos los voltajes, esto se demuestra en la figura 8, en la que se grafica el nivel máximo de corriente a cada voltaje antes y después de la adición de TEA. Un efecto similar al presentado en las figuras 7 y 8 se observó en 4 experimentos.

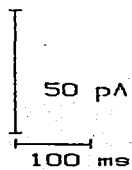
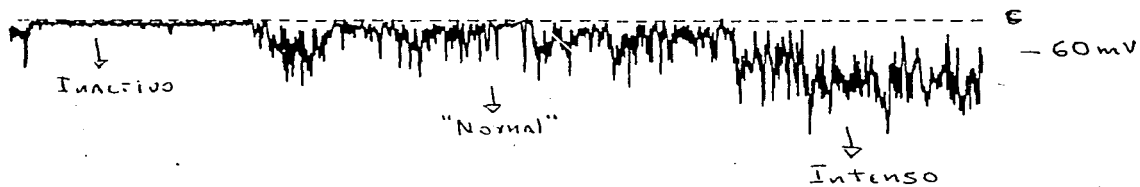
En conclusión, los datos mostrados en las figuras 5 a 8 demuestran que los canales de levaduras, que se incorporan a las bicapas, son bloqueados por  $Ba^{2+}$  y por TEA (ver la discusión).

#### *CARACTERISTICAS CINETICAS GENERALES.*

Como se puede observar en la figura 1A, en las bicapas que presentan muchos canales, se pueden observar periodos de actividad "normal", en los que se aprecian claramente los estados individuales de conductancia (1, 2 y 4 trazos), y éstos alternan con periodos en que la actividad de los canales se vuelve "intensa" (tercer trazo en la figura 1A), de forma tal que no es posible distinguir las fluctuaciones individuales de conductancia. Estos dos modos de actividad alternan a su vez con periodos en los que no hay aperturas de ningún canal, durante por lo menos 250 ms; este comportamiento común a la mayoría de las bicapas con incorporación múltiple de canales, se ilustra con mayor claridad en la figura 9.

*DEPENDENCIA DEL VOLTAJE EN BICAPAS CON INCORPORACION MULTIPLE DE CANALES.*

Figura 9. Fluctuaciones de corriente a  $-60$  mV. Note como la actividad de los canales se divide en periodos de actividad intensa, periodos con cierres simultáneos largos y periodos de actividad intermedia ("normal"). Condiciones experimentales: *cis.* - 300 mM KCl, 0.1 mM  $\text{CaCl}_2$ , 10 mM Hepes-K, pH 8. *trans.* - 100mM KCl, 0.1 mM  $\text{CaCl}_2$ , 10 mM Hepes-K, pH 8. Bicapa PE/PS::1/1. Nótese la escala de tiempo. La letra "c" señala el nivel de cero corriente.



Una forma de estudiar la voltaje-dependencia de los canales responsables de una corriente macroscópica dada, es hacer una gráfica de conductancia relativa de la corriente al pico en función del voltaje, [52]. Así, aunque en nuestro caso no tenemos estrictamente corrientes macroscópicas, decidimos hacer éste análisis midiendo la conductancia de la corriente máxima a cada voltaje. En la fig. 10 se muestra la conductancia relativa, en el instante en que la corriente es máxima, en función del voltaje. En la figura 10 se puede observar que: (i) a 0 mV los canales están poco activados; en concordancia con esto cabe decir que en varias bicapas no se observaron aperturas a 0 mV; (ii) a voltajes positivos, la voltaje-dependencia se manifiesta principalmente por arriba de 40 mV; (iii) la actividad máxima, cuya conductancia relativa se presenta en la figura 10, tiene una dependencia del voltaje muy ligera (ver la discusión).

Con el objeto de obtener información sobre la posible voltaje dependencia de los modos de actividad gruesos, que se observan en las bicapas con incorporación múltiple de canales (fig. 9), se procedió a medir el tiempo promedio (media aritmética) y el número de veces que se presenta cada modo a un voltaje dado; para ello se consideró que los canales están en modo cero de actividad, si pasa un mínimo de 250 ms sin que halla ninguna apertura; como modos de actividad intensa se consideró a aquellos en que la magnitud de la corriente es al menos 5 veces mayor que la correspondiente a la conductancia más pequeña incorporada, la actividad que no pertenece a ninguno de los dos modos anteriores se consideró como la normal.

Figura 10. Conductancia relativa ( $G_{rel}$ ) en función del voltaje.  $G_{rel}$  se calculó como el cociente de la conductancia, de la amplitud de corriente mayor a un voltaje dado, entre la conductancia más grande encontrada al considerar a todos los voltajes. Los puntos a voltajes positivos representan el promedio de 4 experimentos con la cepa silvestre. A voltajes negativos, los triángulos representan el promedio de 3 experimentos con la cepa mutante PC-1, los rectángulos son los puntos de un experimento con la cepa silvestre. Aplicando logaritmos a la parte creciente de las curvas, se encontró que: a voltajes positivos se necesita un cambio de 38.7 mV para que  $G_{rel}$  cambie e-veces; a voltajes negativos se requiere un cambio de 90.6 mV para obtener un cambio de e-veces en  $G_{rel}$ . Condiciones experimentales: *cis*: 300 mM KCl, 0.1 mM  $CaCl_2$ , 10 mM HEPES-K, pH 8. *trans*: 100 mM KCl, 0.1 mM  $CaCl_2$ , 10 mM HEPES-K pH 8. Bicapas PE/PS::1/1.

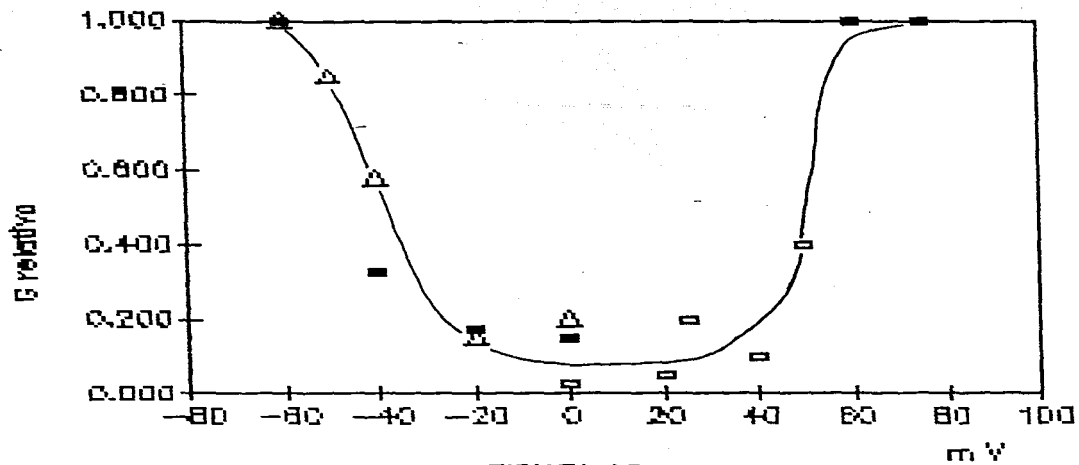


FIGURA 10

En las figuras 11 y 12, se muestran las gráficas del número de veces que se presentó cada modo de actividad en función del voltaje. Como no se tomaron intervalos de tiempo iguales en cada voltaje, el número de veces que se presentó un modo dado, se dividió entre el tiempo total que se midió el voltaje en consideración. En la figura 11 se presentan los promedios obtenidos con tres bicapas de la cepa PC1. En la figura 12, se presentan por comparación datos de una bicapa con canales de la cepa silvestre XT300.3A, en la que, durante los modos de actividad normal, fué posible medir a un solo canal (ver más abajo).

En las figuras 11 y 12 se puede observar que: (a) el número de presentaciones de cada modo de actividad en función del voltaje es cualitativamente similar en las dos cepas; (b) las veces que se presenta la actividad normal parece ser independiente del voltaje; en contraste, (c) los periodos de no-actividad tienden a presentarse con mayor frecuencia a voltajes bajos, y luego disminuyen al aumentar el voltaje, tanto en la dirección positiva como en la negativa; (d) los periodos de actividad intensa tienden a presentarse con un patrón cualitativamente inverso al de los de no-actividad, es decir aumentan con el voltaje.

En las tablas 3, 4 y 5 se muestran los tiempos medios (media aritmética) de los periodos de no-actividad, y actividad normal e intensa respectivamente. De los valores presentados en las tablas se puede ver que: (a) no existe una dependencia clara con el voltaje, del tiempo medio de los periodos de no-actividad (por ese motivo solo se mostraron los datos de 2 bicapas de la PC-1); (b) los tiempos medios de los periodos de actividad normal, de las



Figura 11. Número de presentaciones de los modos de actividad en canales de la cepa PC1. (A) periodos de no-actividad. (B) periodos de actividad intensa. (C) periodos de actividad "normal". Condiciones experimentales como en la figura 1. El número de presentaciones de cada modo se dividió entre el tiempo total (expresado en segundos) que se midió el voltaje en cuestión, para así hacer comparables los valores a distintos voltajes. Los puntos representan el promedio de 3 experimentos. Condiciones experimentales como en la figura 10.

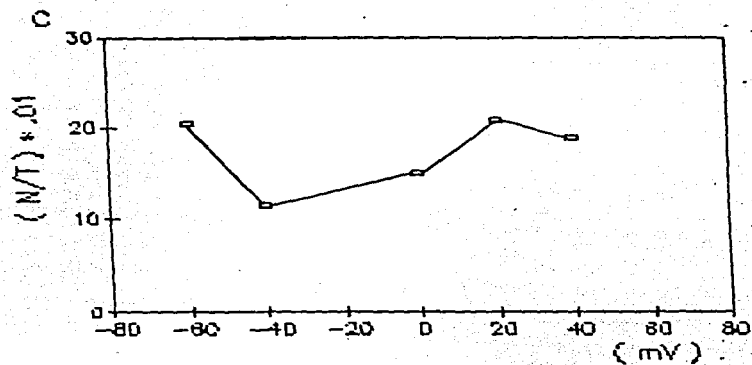
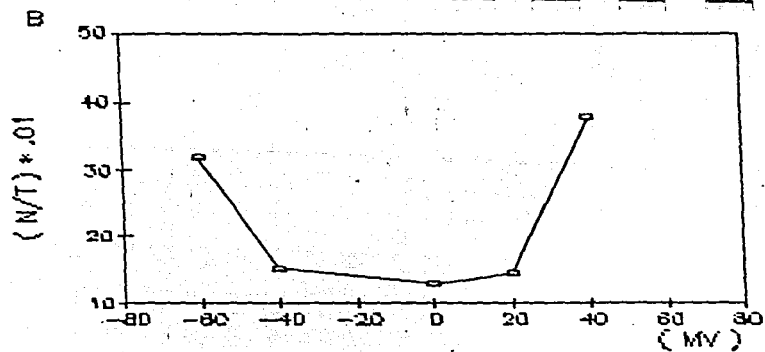
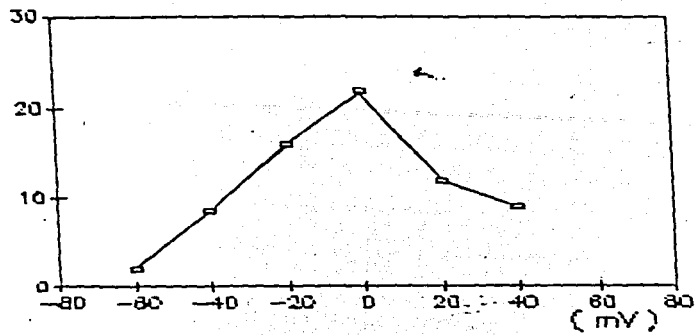


Figura 12. Número de presentaciones de los modos de actividad en una bicapa de la cepa silvestre en que la actividad normal permitió ver a un solo canal. (A) no-actividad. (B) actividad intensa. (C) actividad "normal". Condiciones experimentales como en la figura 10.

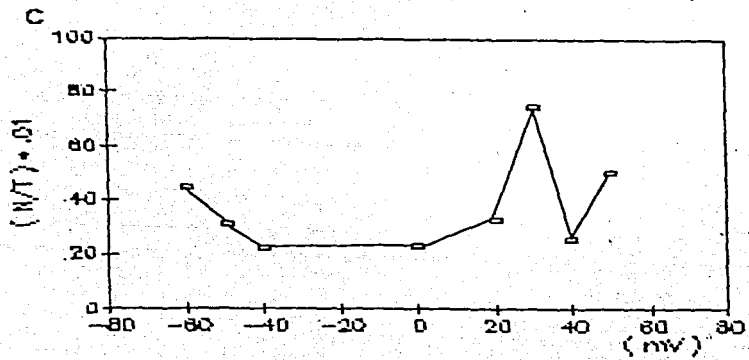
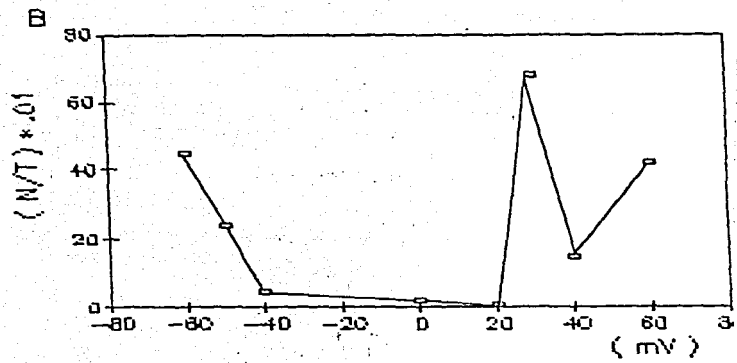
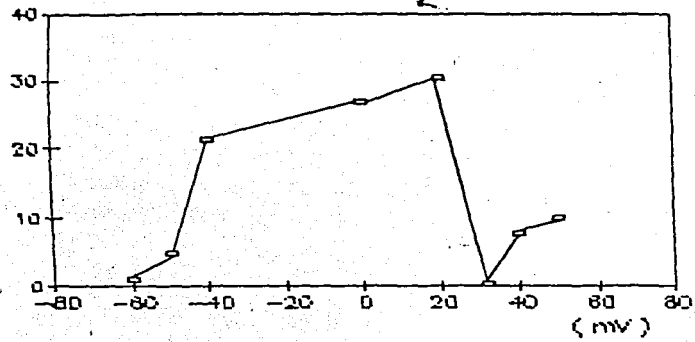


Tabla 3. Tiempo medio de los periodos de no-actividad, medido con el programa pclamp 405, en el modo manual. La segunda y tercera columnas corresponden a canales de la cepa PC1, la última columna corresponde a la bicapa de la Xt3000.3a de la figura 17. Condiciones experimentales como en la figura 1.

(mV)	T(seg)	T(seg)	T(seg)
50	----	-----	$0.3 \pm 0.04$
40	0.5 (1)	$0.6 \pm 0.3$ (2)	$0.7 \pm 0.4$
20	$3.3 \pm 0.9$ (3)	0.3 (1)	$0.42 \pm 0.1$
0	$1.4 \pm 0.4$ (3)	$0.3 \pm 0.1$ (8)	$3.4 \pm 6.5$
-20	$0.3 \pm 0.0$ (2)	nt	nt
-40	0.5 (1)	nd	$2.5 \pm 2.9$
-50	----	-----	$0.9 \pm 0.3$
-60	nm	$1.3 \pm 0.9$ (2)	0.0

nm = no medido; nt = no hubo transiciones; nd = no se determinó porque todas las aperturas se presentaron sobre una lenta.

Tabla 4. Duración promedio de la actividad "normal". Las 3 primeras columnas tienen los datos de las bicapas de la PC1, la última columna es de la bicapa de la xt3000 de la tabla 3.

mV	T <sub>1</sub> , seg	T <sub>2</sub> , seg	T <sub>3</sub> , seg	T <sub>4</sub> , seg
40	1.1 ± 0.5	1.0 ± 0.6	2.7 ± 1.9	3.1 ± 2.7
20	1.7 ± 1.2	1.0	2.6 ± 1.6	2.6 ± 2.5
0	4.2 ± 1.3	1.0 ± 0.8	4.2 ± 1.7	0.5 ± 0.2
-20	nt	0.5 ± 0.1	nt	
-40	6.4 ± 3.3	3.2 ± 1.3	4.0 ± 1.7	1.9 ± 1.9
-50	nm	nm	nm	2.2 ± 2.2
-60	5.3 ± 3.7	nm	4.3 ± 1.6	2.0 ± 1.8

Tabla 5. Tiempo medio de la actividad intensa. Condiciones experimentales como en la figura 1. Las 3 primeras columnas son datos de bicapas con canales de la cepa PC1, la última columna es de una bicapa de la cepa silvestre.

(mV)	T(seg)	T(seg)	T(seg)	T(seg)
50				.8 ± 1.5
40	.35 ± .48	.3 ± .08	.5 ± .7	.2 ± 1
20	.3 ± 0.0	.2 ± .1	.02 ± .01	0.0
0	.1 ± 0.0	.4 ± .04	0.0	0.0
- 40	.1 ± .1	.8 ± 1.1	.12 ± .01	.4 ± .1
- 60	1.4 ± 3.0	.04 ± .04		.2 ± .2

tres bicapas de la PC1 y de la bicapa de la XT300.3A de la tabla 3, muestran, con excepción del dato a 40 mV de la XT300.3A, que existe una tendencia a aumentar con el voltaje en la dirección negativa; (c) la duración promedio (media aritmética) de la actividad intensa no muestra una relación clara con el voltaje.

Cabe señalar que la magnitud de las desviaciones estándar es consecuencia de la forma en que se definieron los modos de actividad; la forma de definirlos permite que un modo dado abarque un rango muy amplio de tiempo, sobre todo para los periodos normales e intensos. De cualquier manera los rangos tan amplios de desviación estándar restan fuerza a cualquier conclusión sobre la dependencia del voltaje de estos tiempos medios por lo que, solo pueden considerarse como sugerentes de la dependencia cualitativa en relación al voltaje. En este sentido, las gráficas de las figuras 11 y 12 (i. e., el número de presentaciones de cada modo) parecen un estimador más adecuado de la voltaje dependencia.

En conclusión, los datos mostrados sugieren que los modos de actividad gruesa que presentan las bicapas con muchos canales muestran voltaje dependencia; esta dependencia se manifiesta en el número de presentaciones de los periodos de no-actividad y de actividad intensa, en la duración promedio de los periodos de actividad normal, y en la conductancia relativa del momento en que la corriente es máxima (fig 10).

COMPORTAMIENTO DE CANALES UNITARIOS. MODO DE ACTIVIDAD NORMAL.



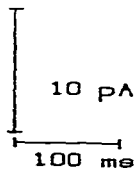
Claramente, los periodos de actividad normal requieren para su caracterización cinética el registro de la actividad de un solo canal (ver más abajo). Sin embargo, de las observaciones hechas arriba (fig 9), se puede intuir que los canales catiónicos de las levaduras tienen por lo menos dos estados cerrados, uno correspondiente a los periodos de cero actividad, en los que todos los canales permanecen cerrados por al menos 250 ms, y otro correspondiente a los cierres más cortos durante los periodos de actividad "normal".

La cinética de los canales durante el modo de actividad "normal" se pudo estudiar, aunque en forma limitada, en 3 bicapas en las que se logró tener registros unitarios.

En una bicapa, las fluctuaciones de corriente, debidas a la apertura y cierre de canales, presentaron sólomente dos valores de conductancia, de 40 y 65 pS. Las transiciones correspondientes a cada conductancia nunca se sumaron, sino que se presentaron una u otra de manera alternada a lo largo de todo el experimento, lo cual permitió medirlas por separado; este comportamiento se muestra en la figura 13.

En el experimento ilustrado en la figura 13, sólo se observó corriente a voltajes positivos en cís, mayores a 0 mV. Es apropiado señalar nuevamente que este comportamiento es congruente con el observado en bicapas con muchos niveles de conductancia, en las que sólo se observan corrientes a voltajes positivos. A 25 mV la transición predominante es la de 40 pS, las aperturas de 65 pS son tan escasas que no fue posible hacer su análisis estadístico. Al aumentar el voltaje las aperturas de 65 pS se vuelven más

Figura 13. Registros de canales de 40 y 65 pS a 75 mV. Condiciones experimentales: cis 300 mM KCl, 0.1 mM CaCl<sub>2</sub>, 10 mM Hepes-K pH 8. trans: 100 mM KCl, 0.1 mM CaCl<sub>2</sub>, 10 mM Hepes-K pH 8. Bicapa PE/PS::1/1. Nótese como las aperturas de 40 alternan con las de 65 pS, sin que se sumen las aperturas; este mismo comportamiento se observó en todos los voltajes en que se registró actividad. El pico menor del histograma de amplitud de corriente, corresponde a la conductancia de 40 pS, y el mayor a la de 65 pS. La letra "c" indica el nivel de cero corriente. Los registros están filtrados a 800 Hz.

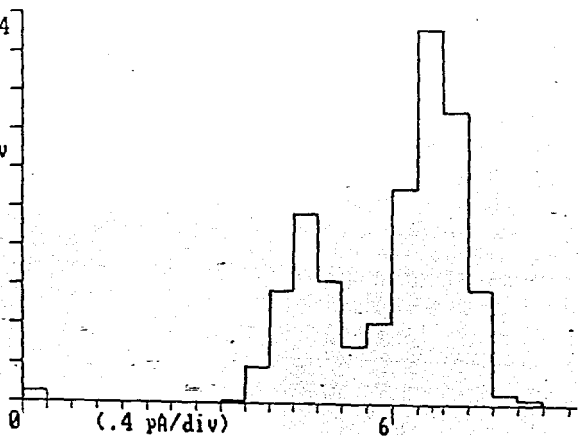


File: F7903F04

679  
Total Events

16 count/div

Amplitude  
Histogram  
669 Events



frecuentes, de tal manera que a 75 mV constituyen la transición predominante. La tabla 6 da la frecuencia relativa de ambas conductancias en el rango de voltaje estudiado.

En las tablas 7 y 8 se dan los tiempos medios de residencia de los estados cerrado y abierto de las transiciones de 40 y 65 pS respectivamente. Los tiempos medios se obtuvieron de la(s) constante(s) de tiempo de la(s) exponencial(es) con que se ajustaron los histogramas de tiempo de residencia [25, 33]. El análisis se efectuó con el programa pclamp 405 (ver Materiales y Métodos). Como se muestra en las tablas, el tiempo de residencia en el estado abierto, de ambas conductancias, decae siguiendo una sola exponencial (hay una sola constante de tiempo), lo que significa que hay solo un estado cinético abierto en cada conductancia; en contraste, el tiempo de residencia en el estado cerrado se ajusta a la suma de dos exponenciales, por lo que hay dos estados cerrados [25].

Las figuras 14 A y 14 B muestran la probabilidad de apertura de los canales ( $P_o$ ). En la figura puede apreciarse que: (i)  $P_o$  es muy baja a todos los voltajes considerados, y (ii) a diferencia del comportamiento mostrado en la fig 10, por arriba de 40 mV no se observa mucha voltaje dependencia.

En el experimento de la figura 13, agregamos  $BaCl_2$  10 mM en ambos lados de la bicapa.

La adición de  $Ba^{2+}$  produjo los siguientes efectos sobre la conductancia de 40 pS: (i) no se pudo detectar la corriente de  $K^+$  a 25 mV, i.e., después de la adición no se observó la conductancia de 40 pS a ese voltaje (tabla 9); (ii) al aumentar el voltaje por

Tabla 6. Frecuencia relativa de las aperturas de 40 y 65 pS. Los datos corresponden a tramos de 38 segundos. Las condiciones experimentales son las mismas que en la figura 1. La frecuencia relativa se calculó como el número de aperturas correspondientes a una conductancia, reportadas en los histogramas de amplitud de corriente, entre el número total de aperturas.

mV	40 pS	65 pS
<0	0.0	0.0
25	1	0
50	0.62	0.38
75	0.30	0.70

Tabla 7. Tiempo medio en los estados cerrado y abierto de las aperturas de 40 pS. Las condiciones experimentales son las mismas que en la tabla 6. Los tiempos medios, son las constantes de tiempo de las exponenciales con que se ajustó los histogramas de tiempo de residencia en los estados abierto y cerrado [25]. El ajuste se realizó con el programa pclamp 405.

---

mV	T cerrado (ms)	T abierto (ms)
25	$\tau_1 = 5.3, \tau_2 = 23.6$	$\tau = 5.0$
50	$\tau_1 = 4.0, \tau_2 = 53.4$	$\tau = 7.7$
75	$\tau_1 = 13.7, \tau_2 = 34.3$	$\tau = 7.0$

---

Tabla 8. Tiempo medio de los estados cerrado y abierto de las aperturas de 65 pS. Las condiciones experimentales son las mismas que en la tabla 6.

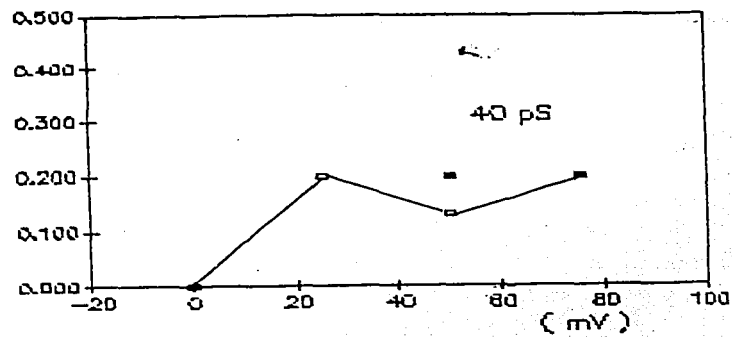
---

mV	T cerrado (ms)	T abierto (ms)
50	$\tau_1 = 3.0, \tau_2 = 13.7$	$\tau = 14.5$
75	$\tau_1 = 10.3, \tau_2 = 24.6$	$\tau = 15.3$

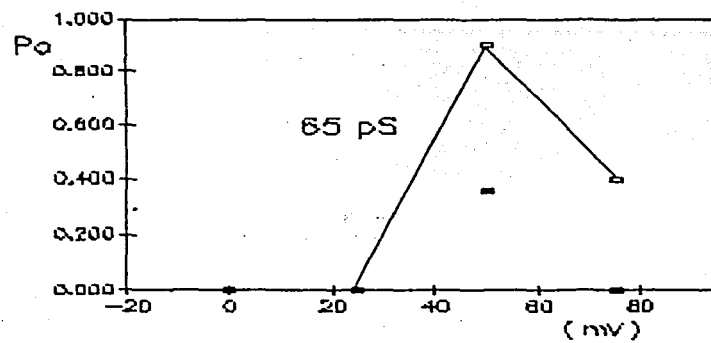
---

Figura 14. Probabilidad de apertura de los canales de 40 y 65 pS. (A) Canales de 40 pS del experimento de la figura 13, la figura muestra la probabilidad de apertura en el control (rectángulos abiertos), y después de la adición de 10 mM de  $Ba^{2+}$  a ambos lados de la bicapa (rectángulos cerrados). Nótese como el  $Ba^{2+}$  no tuvo ningún efecto sobre la probabilidad de apertura. (B) Canales de 65 pS del experimento de la figura 13, la figura muestra la probabilidad de apertura en el control (rectángulos abiertos), y después de la adición de 10 mM de  $Ba^{2+}$  a ambos lados de la bicapa (rectángulos cerrados). Nótese como el  $Ba^{2+}$  disminuyó la probabilidad de apertura. (C) Probabilidad de apertura de canales de 40 pS a voltajes negativos (ver el texto).

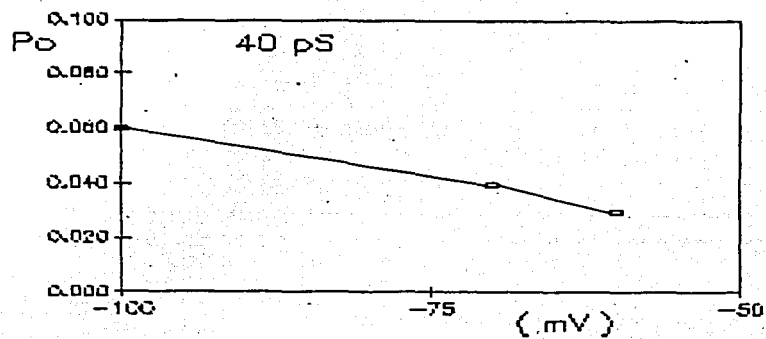
Po



B



C





arriba de 25 mV, se pudo observar nuevamente corriente, y se vio que la conductancia de 40 pS se redujo a 30 pS, sin que hubiera un cambio claro en los tiempos medios cerrados y abiertos (tabla 10). Estos datos indican que el  $Ba^{2+}$  actuó como un bloqueador rápido de la conductancia de 40 pS (ver la discusión).

El  $Ba^{2+}$  tuvo los siguientes efectos sobre la conductancia de 65 pS: (i) a 50 mV se observó un aumento en el tiempo medio total en estados no conductores, sin que hubiera un cambio apreciable en el tiempo medio abierto; (ii) al aumentar más el voltaje (75 mV) el bloqueo aumentó, presumiblemente el tiempo medio no-conductor aumentó, de manera que no se tuvieron suficientes transiciones para hacer un análisis cinético (tablas 9 y 10, figuras 15 A, B). Los resultados sugieren que la conductancia de 65 pS fue objeto de un bloqueo lento por el  $Ba^{2+}$  (ver la discusión).

El efecto de bloqueo por el  $Ba^{2+}$  a nivel unitario es congruente con el bloqueo señalado arriba en bicapas con muchos canales.

Como en la gran mayoría de las bicapas se incorporaba más de un canal, se decidió cosonicar las membranas con asolectina, con el objeto de ver si así se podía disminuir el número de canales incorporados en cada evento de fusión. La cosonicación se efectuó al momento de cargar a las vesículas con sacarosa. Los detalles se dan en los pies de figura correspondientes.

Empleando membranas cosonicadas con asolectina, se logró incorporar un solo canal, con aperturas correspondientes a la conductancia de 40 pS (44 pS), con un potencial de inversión de

Tabla 9. Frecuencia relativa (frec) de las aperturas con control de 40 y 65 pS, después de la adición de 10 mM de  $\text{BaCl}_2$ . Las frecuencias relativas se calcularon como en la tabla 6. Los números entre paréntesis son el valor de conductancia ( $\gamma$ ) correspondiente.

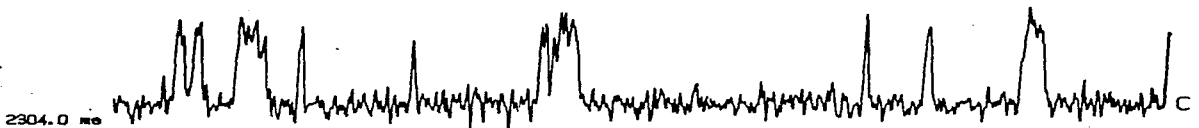
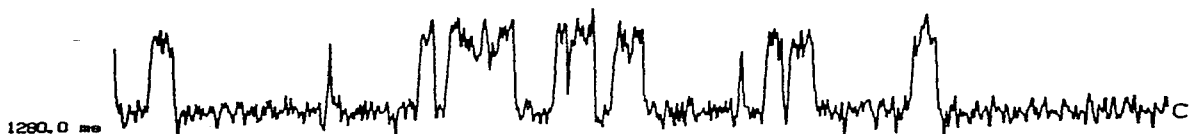
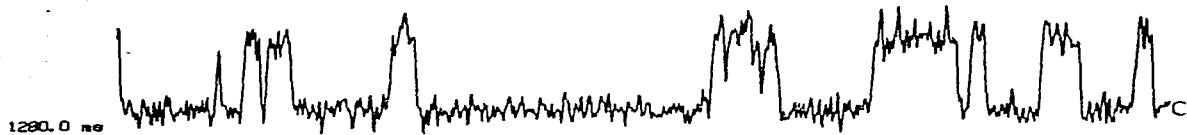
mV	frec ( $\gamma$ )	frec ( $\gamma$ )
25	0.0	0.0
50	0.26 (30)	0.74 (58)
75	0.97 (32)	0.03 (64)

Tabla 10. Tiempos medios de los estados cerrado y abierto de las aperturas, con control correspondiente a 40 y 65 pS, en presencia de 10 mM de  $\text{BaCl}_2$ . Las demás condiciones experimentales son las mismas que en la tabla 6.

mV	pS	T cerrado (ms)	T abierto (ms)
25	40	-----	-----
25	65	-----	-----
50	30	$\tau_1 = 2.3, \tau_2 = 20.8$	$\tau = 6.5$
50	58	$\tau_1 = 7.6, \tau_2 = 21.2$	$\tau = 16.2$
75	32	$\tau_1 = 8.2, \tau_2 = 42.5$	$\tau = 9.3$
75	65	nd	nd

nd = no se determinó debido al número tan pequeño de transiciones.

Figura 15 A. Fluctuaciones de corriente correspondientes a la apertura de 65 pS en el control. Las aperturas aparecen como deflecciones hacia arriba, la letra "c" señala el nivel cero de corriente. Condiciones experimentales como en la figura 13. Nótese como en todos los tramos el nivel de corriente corresponde a 65 pS. Los trazos están filtrados a 800 Hz.



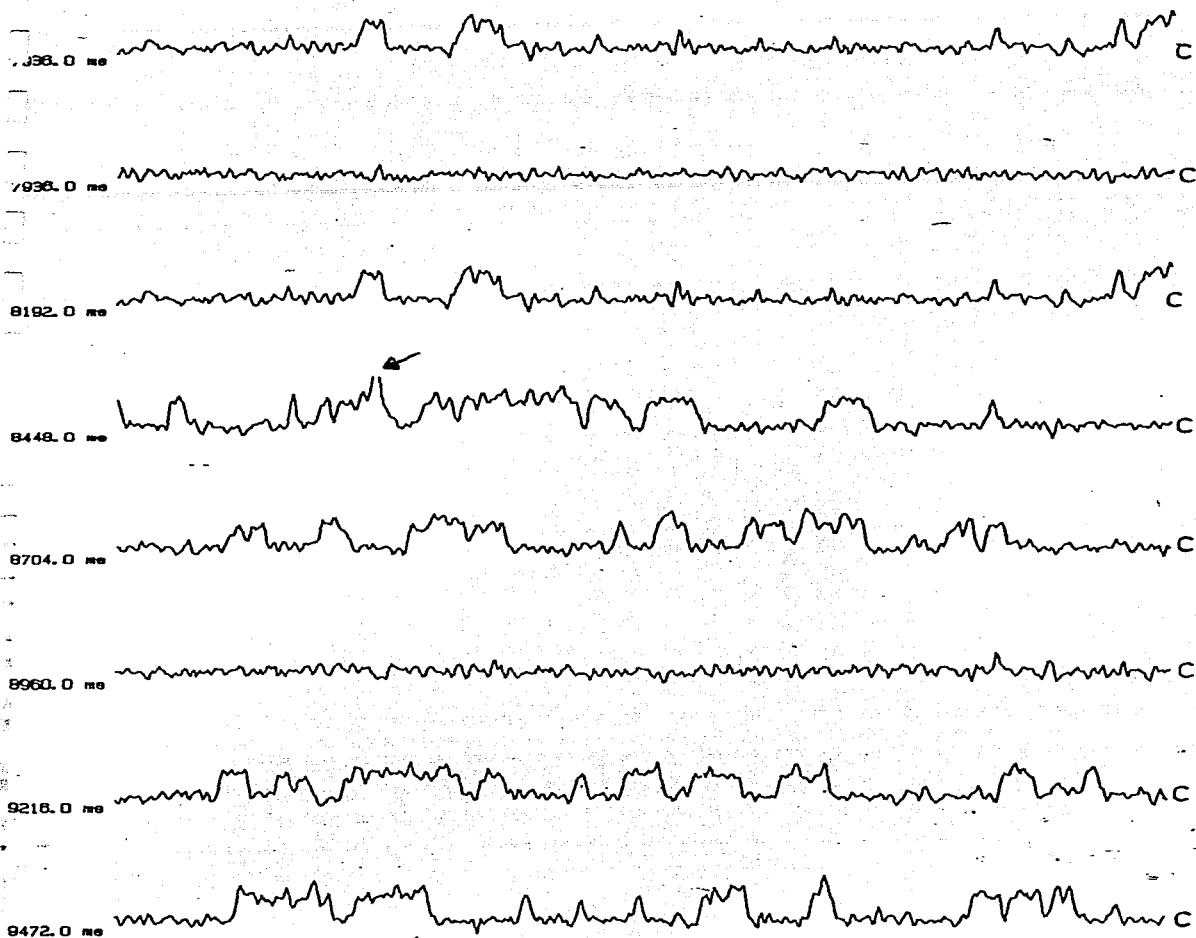
6.7 pA

A vertical scale bar with a horizontal tick at the bottom, indicating a magnitude of 6.7 pA.

File: F7903F04 Date: Time: 0, 00: 00  
Comment:  
Data plotted: 90/06/28 Traces: 1024 samples (512.00 ms)  
Plot notes: 75 mV. contro.g predominante da 64 pS.

40.00 ms

Figura 15 B. Fluctuaciones de corriente correspondientes a la apertura de 40 pS en presencia de 10 mM de Ba. Condiciones experimentales como en la fig 15.A, solo que aquí se agregó 10 mM de BaCl<sub>2</sub> en ambos compartimentos. Nótese como ahora la transición predominante es la de 40 pS, la flecha señala a una transición de 65 pS, que esta cortada porque el programa (pclamp 5.5) realiza un autoescalamiento para poder mostrar todos estos trazos. La letra "c" indica el nivel de cero corriente. Los trazos estan filtrados a 600 Hz.



4.1 pA

File: F7903F08 Date: Time: 0:00:00  
Comments:  
Date plotted: 90/06/26 Traces: 512 samples (256.00 ms)  
Plot notes: 75 mV, 10 mM Ba en cis. g = 40 pS.

20.00 ms

-26 mV (el potencial de Nernst del potasio es de -27.5 mV), en una bicapa formada con una mezcla PE/PS::1/1. A diferencia del comportamiento señalado arriba en el que los canales sólo se abrían al aplicar voltajes positivos (e. g., ver la tabla 6), el canal incorporado sólo se abría con voltajes negativos, lo cual indica que quizá se incorporó al revés. La figura 16 muestra la actividad de este canal a -100 mV. En la tabla 11 se dan los tiempos medios de residencia en los estados cerrado y abierto.

En la tabla 11 puede observarse que: (a) el análisis cinético es nuevamente congruente con un modelo mínimo de un estado abierto y dos estados cerrados; (b) a diferencia de la bicapa en que ésta transición alternaba con la de 64 pS, aquí se observa una clara disminución en el tiempo medio que el canal esta cerrado, a medida que aumenta el voltaje (se hace más negativo). Este comportamiento, junto con la falta de aperturas a voltajes positivos, indica que la apertura de 40 pS es voltaje dependiente, esto se ve más claramente en la figura 14 C. Desafortunadamente, la bicapa se rompió estando a +100 mV, y no se pudo obtener más datos.

Con el empleo de membranas cosonicadas con asolectina, se obtuvo una bicapa en la que es posible observar todo el comportamiento cinético del que se ha hablado. En la bicapa se estimó que se incorporó un máximo de 4 canales funcionales (dividiendo la corriente máxima entre la más pequeña, que fue la de un canal de 62 pS). En esta bicapa, es posible apreciar periodos largos (más de 250 ms) con cero aperturas, alternando con periodos de aperturas múltiples (de actividad "intensa" y duración



Figura 16. Fluctuaciones de corriente de canales de 40 pS a -100 mV. Las aperturas aparecen como deflecciones hacia abajo. Las condiciones experimentales son las mismas de la figura 13, excepto que las membranas se cosonicaron con lípidos de azolectina a una relación de 80  $\mu\text{g}$  de azolectina por cada 8  $\mu\text{g}$  de proteína. La sonicación se efectuó a 0 °C, al momento de cargar con Sacarosa. Los trazos están filtrados a 800 Hz. La letra "c" indica el nivel de cero corriente.

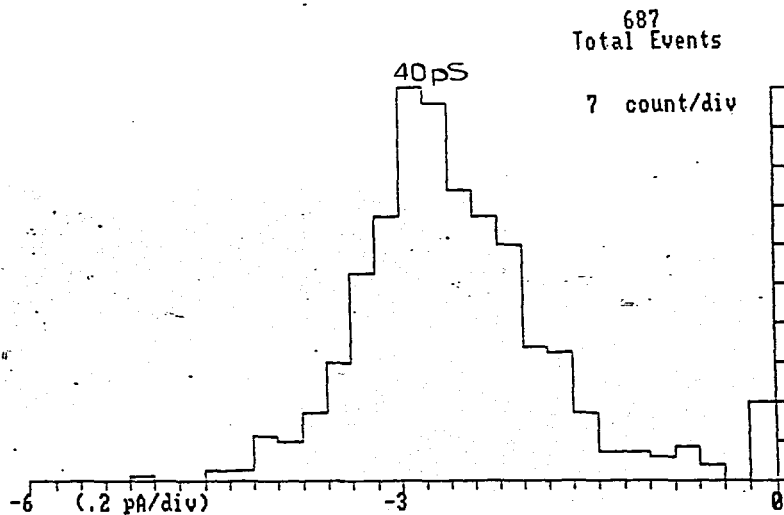
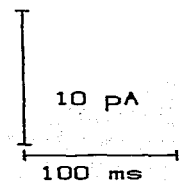
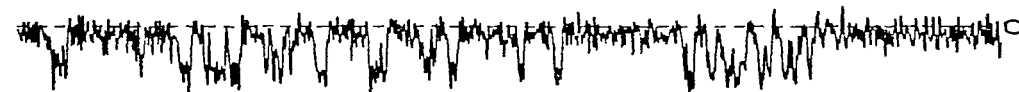


Tabla 11. Tiempo medio de los estados cerrado y abierto de las aperturas de 40 pS. Las condiciones experimentales son las mismas que en la figura 16.

mV	T cerrado (ms)	T abierto (ms)
-60	$\tau_1 = 5.5, \tau_2 = 51.1$	$\tau = 1.8$
-70	$\tau_1 = 5.8, \tau_2 = 32.8$	$\tau = 1.5$
-100	$\tau_1 = 13.7, \tau_2 = 42.4$	$\tau = 3.4$

Tabla 12. Tiempo medio de los estados cerrado y abierto de las aperturas de 65 pS. Condiciones experimentales como en la figura 17.

mV	T cerrado (ms)	T abierto (ms)
20	$\tau_1 = 6.6, \tau_2 = 23.6$	$\tau = 7.6$
32	$\tau_1 = 5.2, \tau_2 = 17.3$	$\tau = 9.5$
-50	$\tau_1 = 4.9, \tau_2 = 18.0$	$\tau = 3.6$
-60	$\tau_1 = 4.4, \tau_2 = 26.3$	$\tau = 12.5$

variable), y con periodos de actividad normal, en los que solo se observan aperturas de un solo canal. Su conductancia correspondiente fue de 65 pS (62 pS), con un potencial de inversión de -22 mV ( $E_{K^+} = -27.5$  mV); la actividad de este canal se muestra en la figura 17. En esta bicapa los canales abrian tanto a voltajes positivos como negativos. En la tabla 12 se dan los tiempos medios de los estados cerrados y abierto, de las aperturas de 62 pS, en los voltajes en los que fue posible medir solo este nivel de corriente. Nuevamente, como con las aperturas de 40 pS, en los periodos de actividad normal, las aperturas de 65 pS presentan un estado abierto y dos cerrados.

#### EFECTO DE BLOQUEADORES DE CANALES DE $K^+$ EN LA FISILOGIA DE LAS LEVADURAS.

Se ha reportado que la entrada de carbohidratos y aminoácidos a las levaduras ocurre por cotransporte con  $H^+$ , y que la carga neta transportada es balanceada por un eflujo de  $K^+$ , por un sistema de transporte distinto, sin que hasta ahora se haya dicho nada acerca de la identidad del sistema por el que sale el potasio [60, 121]. Así, nosotros decidimos comenzar a explorar la identidad del sistema responsable de la salida de  $K^+$ , viendo el efecto de bloqueadores de canales de  $K^+$  sobre la entrada de leucina y citrulina a las levaduras. Como reportamos en el congreso de la Biophysical Society [44], la fig. 18 muestra que la entrada de ambos aminoácidos es fuertemente inhibida por la adición de TEA y de 4- AP, sin embargo como ambos son compuestos

Figura 17. Fluctuaciones de corriente correspondientes a la apertura y cierre de los canales de 65 pS de la tabla 14 D, a - 50 mV. Las aperturas aparecen como deflecciones hacia abajo, cada tramo corresponde a 320 ms. Condiciones experimentales como en la fig 16. Los trazos están filtrados a 800 Hz. La letra "c" indica el nivel cero de corriente.

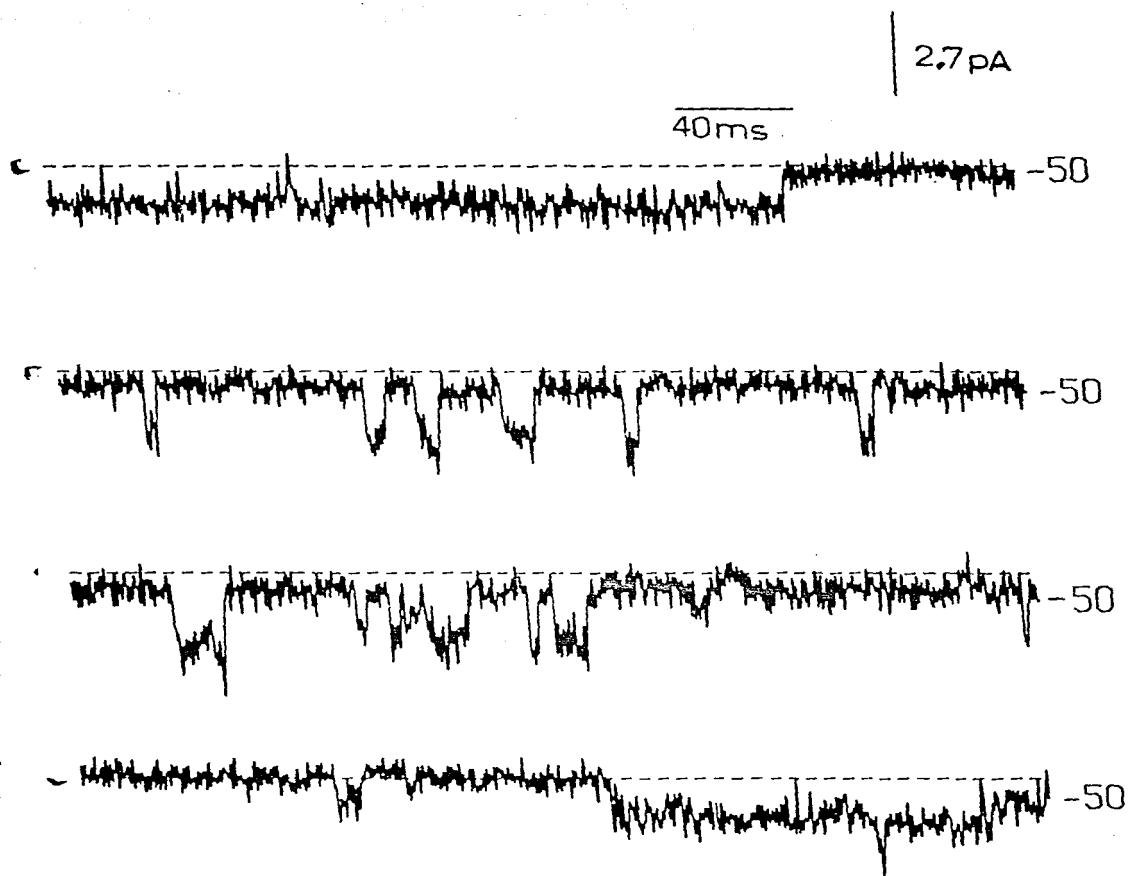


Figura 18. Efecto de la adición de TEA y la 4-aminopiridina sobre la entrada de 100  $\mu$ M de  $H^3$ -leucina a levaduras *S. cerevisiae* obtenidas comercialmente (La Azteca. S. A. México D. F). Los bloqueadores se adicionaron al momento de agregar el aminoácido. Las células se precubaron por una hora en una solución de 150 mM glucosa, 10 mM MES-trietanolamina pH 6.0. En la gráfica se muestra un experimento representativo. El mismo efecto se ha visto en 4 experimentos. Un efecto similar se observó también sobre la entrada de  $C^{14}$ -citrulina (datos no mostrados).

% DEL CONTROL

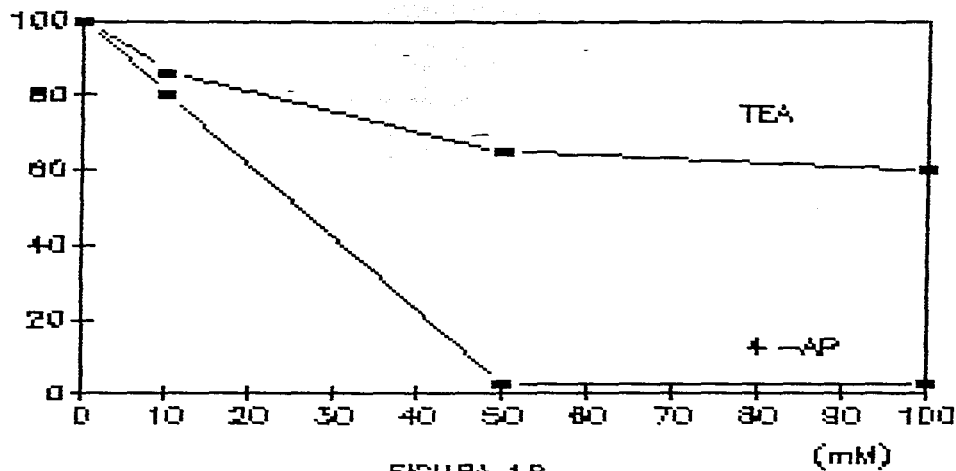


FIGURA 18



aminados no se puede descartar un efecto directo sobre las permeasas de aminoácidos, sobre todo tomando en cuenta que nosotros no hemos visto, hasta ahora, un efecto claro de bloqueo por la 4-AP sobre los canales. De cualquier manera este resultado preliminar se ve muy atrayente para su posterior desarrollo, por lo que no quisimos dejar de mostrarlo.

## DISCUSION Y CONCLUSIONES

La membrana de las levaduras presenta una elevada permeabilidad al potasio, la cual hasta 1986 se trató de explicar únicamente en términos de la actividad de permeasas para este ion [17]. Si bien es cierto que en algunos trabajos se hace mención de que en la permeabilidad al  $K^+$  podrían estar involucrados canales iónicos (ver por ejemplo la referencia 31), el manejo de esta idea en la literatura era más bien rara. En consecuencia no se habían efectuado estudios dirigidos a buscar, aunque fuera de manera indirecta, una posible participación de canales iónicos en la permeabilidad al  $K^+$  que presentan estas células.

La aparición en 1986, del primer reporte sobre la existencia de canales en levaduras [46], coincidió con el montaje en nuestro laboratorio, por M. Calahorra, de la técnica de aislamiento de membranas plasmáticas [19], desarrollada por el grupo de V. Cirillo [41]. De esta forma decidimos incorporarnos al estudio de los canales iónicos de estas células aprovechando las preparaciones de membranas aisladas, para así registrar los canales mediante un enfoque alternativo al del patch-clamp. Así, el primer enfoque que se intentó fue el de la formación de bicapas en la punta del electrodo de patch-clamp. Estos primeros experimentos fueron efectuados por A. Liévano en el laboratorio del Dr. A. Darszon en el CINVESTAV, y en ellos nunca fue posible registrar la actividad de canales de levaduras. Considerando lo anterior, se decidió tratar de registrar a los canales mediante su

incorporación a bicapas lipídicas negras.

El presente trabajo muestra que los canales de la membrana plasmática de levaduras se pueden estudiar en bicapas lipídicas negras [45].

#### TIPOS DE CANALES DE LEVADURAS REGISTRADOS EN BICAPAS NEGRAS.

Como se muestra en las figuras 1 y 3, en la mayoría de las bicapas se observaron varios niveles de corriente correspondientes a la apertura de canales. La presencia de varios niveles de corriente parece deberse a la incorporación múltiple de canales, más que a la existencia de subestados de apertura de un mismo canal. La conclusión anterior se basa en: (i) las dos conductancias encontradas con mayor frecuencia, son las dos más pequeñas; (ii) en un experimento (fig 3) todos los niveles de corriente eran múltiplos de una de las dos conductancias menores (65 pS), (claramente en las otras bicapas, los niveles de corriente, siempre se podrán expresar como una combinación de las corrientes de 40 y 65 pS); (iii) únicamente las dos conductancias menores (40 y 65 pS) se han podido registrar a nivel unitario.

La incorporación múltiple de canales sugiere que los canales de levaduras se encuentran (al menos en nuestras condiciones de trabajo) agrupados en racimos más que distribuidos uniformemente en la membrana ya que: (i) se obtuvo incorporación múltiple aún en aquellas bicapas en las que se procedió a eliminar el gradiente osmótico, y por lo tanto a detener la fusión, en cuanto se detectó la incorporación de los canales; (ii) se ha obtenido incorporación

múltiple aún sonicando las membranas con liposomas de asolectina antes de fusionarlas con la bicapa; (iii) se ha reportado que levaduras que presentan una mutación en el gen estructural de la  $H^+$ -ATPasa, muestran también modificaciones en las propiedades de sus canales de  $K^+$  [107]. Una de las posibles explicaciones que se dió a este fenómeno es que probablemente exista una interacción física entre las ATPasas y los canales [107]; si es así, esto sugiere que los canales podrían estar en racimos, en particular alrededor de ATPasas. Cabe señalar que ya en otras preparaciones se ha demostrado que los canales de potasio se pueden encontrar formando racimos, lo cual hace muy difícil el registro de la actividad de un solo canal [61, 67, 106].

En la discusión de arriba, de ninguna manera se quiere decir que los canales de levaduras no presentan subestados de apertura, pues es bien conocido que prácticamente todos los canales los presentan (5, 39, 87, 115). Lo que se quiere decir es, simplemente, que estos subestados no parecen ser los causantes de los múltiples niveles de corriente, comunmente encontrados con la relación señal a ruido de nuestro sistema.

Los canales registrados en las bicapas fueron permeables al  $K^+$ , ya que: (i) a 0 mV, con un gradiente de KCl de 3 a 1 en *cis* respecto de *trans*, la dirección de la corriente era la correspondiente al paso de cationes ( $K^+$ ) de *cis* a *trans* (fig 3). Sin embargo en algunas bicapas no se observaron aperturas de canales a 0 mV, ya que la probabilidad de apertura a este voltaje es muy baja (figs 10, 14); (ii) el potencial de inversión de todas las conductancias, hasta ahora registradas (tablas 1 y 2), es muy

cercano al potencial de Nernst para el potasio (-27.5 mV, para un gradiente de  $K^+$  de 3 a 1), lo que indica que los canales son permeables al  $K^+$ .

Los canales de 65 pS seleccionan al  $K^+$  sobre el  $Na^+$  con una relación de permeabilidades medida de 2. Debido a la presencia de varios canales en cada bicapa, para poder calcular la relación de permeabilidades, se supuso que los canales no rectifican al reemplazar al  $K^+$  por el  $Na^+$ . Esta suposición está fundamentada en el reporte inicial sobre estos canales [46] en donde, haciendo patch clamp, al reemplazar a 100 mM de  $K^+$  por 100 mM de  $Na^+$ , se observó solo una ligera disminución en la conductancia (en ese trabajo, no se dió el valor de permeabilidad relativa para estas iones). Sin embargo, al sustituir al  $K^+$  del lado cis por  $Na^+$ , llegamos a observar una disminución en el paso de corriente de cis a trans, este efecto se muestra en la fig 4 A y B, por lo que el valor de permeabilidad relativa reportado [45] solo debe de tomarse como una indicación de que los canales de 65 pS seleccionan al  $K^+$  sobre el  $Na^+$ , el valor numérico exacto deberá de checarsé en bicapas que presenten un solo canal.

En los estudios de patch-clamp se ha reportado un solo valor de conductancia unitaria de los canales de  $K^+$  que es de 20-27 pS en 150 mM de  $K^+$  a pH 7.2 [46]. Este nivel es muy cercano al de 40 pS, y no muy alejado del de 65 pS, detectados en nuestro sistema. La diferencia en conductancia entre ambos sistemas se puede explicar de varias maneras: (i) la diferencia en las concentraciones de  $K^+$  empleadas; (ii) posibles modificaciones de los canales, ya sea en el proceso de purificación de las membranas

en nuestro laboratorio, y/o en el proceso de formación de protoplastos, en los estudios con patch clamp; (iii) diferencias entre las cepas de levaduras estudiadas; (iv) diferencias en las condiciones de crecimiento de las células, ya que es bien conocido que estas afectan notablemente las propiedades de sus sistemas de transporte (por ejemplo ver 68). Los distintos valores de pH de trabajo no parecen ser la causa de la diferencia entre las conductancias (datos no mostrados), ni tampoco las diferencias en el potencial de superficie de las membranas (ver tabla 1). Así, en cuanto a los valores de conductancia se refiere, la principal diferencia con los datos de patch clamp esta en que, con el empleo de esa técnica, solo se ha reportado un valor de conductancia para los canales de  $K^+$ , en tanto que nosotros pensamos que tenemos 2 tipos de canales, de 40 y 65 pS (ver abajo).

**BLOQUEADORES DE LOS CANALES DE LEVADURAS REGISTRADOS EN BICAPAS NEGRAS.**

ESTA TESIS NO DEBE SALIR DE LA BIBLIOTECA

Los canales iónicos pueden considerarse como una clase de enzimas muy eficientes (ver la Introducción), vistos de esta manera, los bloqueadores de canales pueden considerarse como ligandos inhibitorios en equilibrio con un sitio de unión del canal [89].

De la misma forma en que las transiciones entre cierres y aperturas de los canales son aleatorias, el bloqueo también ocurre de manera aleatoria. En la mayor parte de los casos, durante el tiempo que el bloqueador se encuentra unido al canal, el flujo de

corriente se interrumpe de manera completa, y la conductancia es indistinguible de la de los periodos cerrados normales del canal; así, para poder distinguir entre los estados cerrados y bloqueados se requiere de un análisis cinético [26, 89] (tal vez la única excepción a este mecanismo de bloqueo es la descrita por Prod'hom et al., 1987 [105]).

En términos cinéticos la manera en que se manifiesta un evento de bloqueo, depende del tiempo de residencia del bloqueador en su sitio de unión en el canal. Si el tiempo de residencia del bloqueador es mucho mayor que el tiempo medio cerrado del canal (bloqueo lento), entonces el bloqueo aparece como cierres largos, interrumpidos por periodos en los que el canal se abre y cierra normalmente. Si el tiempo de residencia del bloqueador es del mismo orden de magnitud que el tiempo medio cerrado del canal (bloqueo intermedio), entonces el bloqueo sólo se manifiesta como un nuevo componente en la función de distribución de los tiempos cerrados del canal. Por otro lado, si el bloqueador tiene un tiempo de residencia tan corto que cae fuera del límite de resolución del sistema de registro (bloqueo rápido), que generalmente es a lo más de 100  $\mu$ seg, entonces los eventos de asociación y disociación del bloqueador son filtrados y se manifiestan como una conductancia unitaria aparente menor del canal [25, 26, 52, 88] (para varios ejemplos de todos estos tipos de bloqueo vea a Moczydlowski et al [89]).

Dado que los canales de levaduras que se incorporan a las bicapas son permeables al  $K^+$ , se decidió estudiar el efecto de los

bloqueadores de canales de  $K^+$  TEA,  $Ba^{2+}$ , y 4-AP.

#### EFEECTO DEL BARIO SOBRE LOS CANALES DE LEVADURAS

La adición de  $Ba^{2+}$  a bicapas con muchos canales produjo una disminución en los niveles de corriente en todos los voltajes aplicados (fig 5, 6), lo que demuestra que el  $Ba^{2+}$  bloquea a los canales de levaduras incorporados en las bicapas. Cabe señalar que en el reporte inicial de Gustin et al sobre los canales de levaduras, se menciona que el  $Ba^{2+}$  bloquea a los canales registrados con el patch-clamp, pero no se mostró ningún dato [46].

El bloqueo por bario se observó a nivel unitario en una bicapa en que se presentaron solamente aperturas de 40 y de 65 pS en forma alternada. La adición de  $Ba^{2+}$  tuvo un efecto distinto sobre cada conductancia.

El  $Ba^{2+}$  a una concentración de 10 mM, tuvo los siguientes efectos sobre la conductancia de 40 pS: (i) a 25 mV no se pudieron apreciar las aperturas de 40 pS (tablas 6 y 9); (ii) por arriba de 25 mV, se volvieron a apreciar aperturas sin que hubiera ninguna diferencia cinética significativa de éstas con respecto al control, según se aprecia al comparar las constantes de tiempo de los estados cerrados y abiertos, sin embargo; (iii) por arriba de 25 mV se observó una reducción de un 25 % en la magnitud de la conductancia de 40 pS (tabla 10). Los resultados enumerados arriba señalan que la conductancia de 40 pS fué objeto de un bloqueo rápido por el  $Ba^{2+}$ , la no detección de aperturas a 25 mV se debió a que la reducción en la corriente unitaria hizo difícil su detección.



El  $Ba^{2+}$  a una concentración de 10 mM, tuvo el siguiente efecto sobre la conductancia de 65 pS: (i) no se produjo ningún cambio apreciable en la magnitud de ésta conductancia, sin embargo; (ii) a 50 mV se produjo un incremento en el tiempo medio total de no-conducción de los canales (28.8 ms contra 16.7 ms del control), sin que hubiera ningún cambio en el tiempo medio abierto (16.2 ms contra 16.5 ms del control); (iii) a 75 mV, el número de veces que se observaron aperturas de 65 pS fué tan pequeño que no se pudo hacer su análisis cinético (tabla 9). Esto sugiere que la intensidad del bloqueo por  $Ba^{2+}$  aumentó con el voltaje (hubo un incremento considerable en la duración del estado no-conductor), de tal manera que a 75 mV, la conductancia de 65 pS pasó la mayor parte del tiempo en estados no-conductores, como si se tratase de un bloqueo lento.

De la discusión anterior se puede concluir que: (i) Tanto la conductancia de 40 como la de 65 pS son bloqueadas por  $Ba^{2+}$ ; (ii) el mecanismo de bloqueo es diferente para cada conductancia, por lo tanto; (iii) la disminución en los niveles de corriente, que causa la adición de  $Ba^{2+}$  en bicapas con muchos canales, parece operar a través de mecanismos distintos según las conductancias incorporadas, y no a través de un único mecanismo de bloqueo actuando sobre una población homogénea de canales.

También cabe señalar que el experimento con canales unitarios, en el que el  $Ba^{2+}$  tuvo un efecto distinto sobre cada conductancia, sugiere que éstas corresponden a canales diferentes y no a subestados de un mismo canal [40], la presentación en forma alternada de ambas, podría entonces indicar que ambos canales no

son independientes.

Con el objeto de dar un marco de referencia a la discusión presentada arriba, conviene mencionar que bloqueo por  $Ba^{2+}$  ha sido descrito en varias clases de canales de  $K^+$  [9, 10, 81, 84, 96, 134], sin embargo, el mecanismo de bloqueo ha sido extensamente caracterizado a nivel de canal unitario sólo en canales de  $K^+$  activados por  $Ca^{2+}$  de alta conductancia ( $K(Ca)$ ). En estos canales el  $Ba^{2+}$  actúa como un bloqueador lento uniéndose a un sitio situado dentro del poro conductor del canal, de tal forma que produce estados no-conductores largos, de una duración promedio de 5 segundos independientemente del voltaje [84, 85, 134]. Es posible sin embargo que el mecanismo de bloqueo no sea el mismo en todos los canales de  $K^+$ , ya que en el  $K(Ca)$  la unión del  $Ba^{2+}$  estabiliza la conformación abierta del canal [85], en tanto que en los canales conocidos como rectificadores tardíos parece ser que la unión del  $Ba^{2+}$ , así como del  $Ca^{2+}$ , estabiliza la conformación cerrada del canal [11, 81].

#### *EFEECTO DEL TEA SOBRE LOS CANALES DE LEVADURAS*

La adición de TEA a bicapas con muchos canales produjo una ligera reducción en los niveles de corriente a cada voltaje (figs 7, 8), lo que demuestra que el TEA bloquea a los canales, pero que la sensibilidad de éstos hacia el TEA es muy pequeña.

Como no tuvimos experimentos de bloqueo por TEA sobre un sólo canal, no podemos decir nada a cerca del mecanismo de bloqueo, y cabe señalar que tampoco en los trabajos hechos con patch-clamp se ha estudiado éste punto. No obstante conviene mencionar que, al igual que en el caso del  $Ba^{2+}$ , el bloqueo por TEA ha sido descrito

en muchos tipos de canales de  $K^+$  [7, 8, 52, 114]. A nivel de canal unitario, ha sido estudiado tanto en canales muy sensibles al TEA, como el  $K(Ca)$ , como en canales muy poco sensibles, como los canales de  $K^+$  modulados por serotonina. En ambos tipos de canales, el TEA produce un bloqueo rápido que se manifiesta como una disminución en la magnitud de la corriente unitaria [125, 135].

Es importante hacer notar que los canales de  $K^+$  difieren considerablemente en su sensibilidad al TEA, así como en general a los iones con nitrógenos cuaternarios [114, 133]. Más aún, algunos de estos iones como el TMA actúan también como bloqueadores rápidos de otros canales, como por ejemplo de canales de  $Na^+$  [89].

La 4-aminopiridina, un bloqueador muy conocido de canales de  $K^+$  que actúa con mayor eficiencia sobre los canales tipo "A" [114, 133], no tuvo ningún efecto apreciable sobre los canales de las levaduras en el rango de concentración de 0.1 a 5 mM (datos no mostrados).

Como se mencionó al inicio de la discusión, prácticamente no existen datos acerca del papel fisiológico de los canales en las levaduras, por este motivo decidimos indagar el efecto del bromuro de etidio sobre los canales (ver la introducción), a una concentración de 100  $\mu M$ , a la cual se sabe que este compuesto bloquea el influjo de  $K^+$  a las células, sin afectar a otros procesos, como el bombeo de  $H^+$  [103]. En 8 experimentos no se observaron efectos consistentes de este compuesto (datos no mostrados). Por lo tanto, todo parece indicar que el bromuro de

etidio actua sobre la(s) permeasa(s) para el potasio.

#### *ACTIVIDAD Y DEPENDENCIA DEL VOLTAJE EN BICAPAS CON MUCHOS CANALES.*

En las bicapas con muchos canales, su actividad se presenta de tres formas: periodos de no-actividad en que los canales permanecen simultaneamente cerrados por más de 250 ms; periodos de actividad intensa de duración muy variable, y periodos de actividad normal (intermedia), también de duración muy variable; Debido a la duración tan variable de los modos de actividad, no es posible observar una dependencia clara de la duración de la media aritmética de estos con el voltaje (tablas 3 a 5). Sin embargo el número de veces que se presentan los modos de no-actividad, muestra dependencia del voltaje siendo más frecuentes a voltajes menores a  $\pm 40$  mV (fig 11 y 12). Analogamente, el número de veces que se presenta la actividad intensa es dependiente del voltaje, siendo más frecuentes a voltajes por arriba de  $\pm 40$  mV. Estos datos sugieren, aunque sea de manera cualitativa, que cuando en una bicapa se incorporan varios canales, la actividad de al menos algunos de ellos es dependiente del voltaje. Esta conclusión, es reforzada por las curvas de corriente máxima en función del voltaje de las figuras 6 y 8, en donde se observa una clara desviación del comportamiento ohmico.

Como parte de la caracterización del comportamiento de las bicapas con muchos canales, decidimos graficar la conductancia relativa, en la transición con mayor amplitud de corriente a un voltaje dado, en función del voltaje. La gráfica de la figura 10

muestra que, en las bicapas con incorporación múltiple de canales, la actividad de estos en el momento en que se hace máxima, es ligeramente dependiente del voltaje. A voltajes positivos, un cambio de 39 mV cambia en e-veces la conductancia. A voltajes negativos un cambio de 90.6 mV causa un cambio de e-veces en la conductancia. Como punto de comparación, y aunque no se trata de medidas equivalentes, cabe señalar que en los canales de  $K^+$  del axón gigante de *Loligo*, que son considerados típicamente como dependientes del voltaje, hay un incremento de e-veces en su conductancia por cada 4.8 mV, para depolarizaciones pequeñas [52]. En la figura 10 se representa la dependencia del voltaje de un evento puntual (i.e., la conductancia en el momento en que ésta se hace máxima, y no la conductancia de una corriente macroscópica como tal).

#### *CINETICA Y DEPENDENCIA DEL VOLTAJE DE CANALES UNICOS.*

En tres ocasiones logramos registrar la actividad de canales únicos. De hecho, dadas las características de la bicapa de la fig 13, registramos 2 veces canales de 40 pS y dos veces canales de 65 pS. Sin embargo, las propiedades cinéticas entre ellos no son directamente comparables ya que (i) los canales de 40 pS se incorporaron de distinta manera (al menos eso pensamos), (ii) en una ocasión los canales de 65 pS (fig 17) se encontraban, de acuerdo a la interpretación de incorporaciones múltiples por la que nos hemos inclinado, junto con otros canales, y se registraron aperturas únicas de 65 ps tanto a voltajes positivos como a

negativos. No es posible saber si las transiciones a ambos voltajes son del mismo canal (con cinética modificada), o son de dos canales distintos.

En todos los casos, la distribución de los tiempos de residencia en los estados abiertos y cerrados (tablas 7, 8, 11 y 12) es consistente con la existencia de 2 estados cerrados y un estado abierto, para ambas conductancias [25]. El inverso del tiempo medio de apertura es la constante de velocidad de salida del estado abierto [25], suponiendo el siguiente arreglo:



Las constantes de velocidad de salida de los estados cerrados, son el inverso de los tiempos medios de residencia en cada estado [25]. Estos tiempos medios están dados en las tablas 7, 8, 11 y 12.

Las gráficas de  $P_0$  muestran sólo una ligera dependencia del voltaje. Por otro lado, como ya se mencionó arriba, la dependencia del voltaje de la conductancia máxima que alcanzan las bicapas con más de un canal (fig 10), también muestra sólo una ligera dependencia del voltaje. Otra forma en que se manifestó la dependencia del voltaje de los canales, es en que abren sólo a voltajes positivos o negativos, según su orientación en la bicapa.

Ya antes hemos argumentado que pensamos que los canales de levaduras se encuentran en racimos. A partir del comportamiento tanto de las en bicapas con muchos canales, como de aquellas en que se pudo registrar la actividad de canales unitarios, nos inclinamos a pensar que en los racimos la actividad de los canales individuales no es independiente, ya que:

(i) En los 3 registros con actividad de canal unitario que obtuvimos, no se observaron períodos de actividad intensa, como los llamados periodos de rafaga ("bursts") que presentan algunos tipos de canales. Así, si no se piensa que la actividad de los canales es interdependiente, es difícil entender porque cuando hay incorporación múltiple de canales, se presentan periodos de una actividad muy intensa, que luego relajan a periodos de menor actividad o inclusive sin actividad (es importante recordar que ésta actividad intensa de los canales de levaduras, también se ha observado en otros dos laboratorios [46, 107]).

(ii) En todas las bicapas con incorporación múltiple de canales, junto con los periodos de actividad intensa, siempre se pudieron observar cierres simultáneos de todos los canales (e.g., vea la fig 1), es decir periodos en los que la conductancia de la membrana se hacia cero durante un tiempo variable. Si los canales son independientes la ocurrencia de estos cierres simultáneos resulta muy poco probable. Así, consideremos por ejemplo de manera arbitraria, que en una membrana hubiera un canal de 40 pS (tiempo medio de apertura de 7.7 ms a 50 mV), y dos de 65 pS (tiempo medio de apertura de 16.5 ms a 50 mV), que sería una de las condiciones mínimas en que hablaríamos de incorporación múltiple; entonces la probabilidad de que los tres canales, siendo independientes, se cerraran simultáneamente, durante un periodo de por ejemplo 2 mseg, es:  $[1 - \exp(-2/7.7)] * [1 - \exp(-2/16.5)]^2$ , que es  $3.0 * 10^{-3}$ . Por lo tanto, la observación frecuente de cierres simultáneos en todas las bicapas con muchos canales, sugiere que éstos no son independientes.

(iii) En el experimento de la figura 13, se observaron aperturas de 40 y 65 pS, siempre en forma alternada. Estas conductancias fueron bloqueadas cada una en forma diferente por el  $Ba^{2+}$ ; esto sugiere que la bicapa tenía dos canales distintos, uno de 40 y otro de 65 pS, y no a un solo canal con dos niveles de conductancia [39]. Entonces la presentación en forma alternada de los dos canales, nos indica que su actividad no era independiente.

(iv) En el estudio efectuado con la levadura mutante pma1 se dió, como una posible explicación de los resultados (ver introducción), la posible interacción física entre canales y ATPasas, claramente esto implica que los canales están en grupos, y que no son independientes [107].

Se ha demostrado que muchos tipos de canales se encuentran formando racimos. Incluso, algunos autores han llegado a sugerir que es en forma de racimos como generalmente se encuentran los canales en las membranas biológicas [41, 106]. En algunos casos, como con las porinas de bacterias, los racimos persisten aún después de disolver la membrana con detergentes [82]. En algunos casos se ha mostrado que dentro de un racimo los canales son independientes [61], pero también hay reportes que muestran que, en los racimos, las propiedades de algunos canales no son las mismas que cuando están aislados, así por ejemplo, el receptor de acetilcolina presenta propiedades distintas cuando se encuentra en forma de monomero, que cuando se encuentra en su estado normal de dímero [119]. Finalmente, cabe mencionar, que además de en las levaduras, también en otros microorganismos (bacterias) se han observado canales con una cinética muy compleja, y se ha concluido



que su actividad no es independiente [143].

#### *EFFECTO DE BLOQUEADORES DE CANALES DE POTASIO EN LA FISIOLOGIA DE LAS LEVADURAS*

En cuanto al posible papel fisiológico de los canales, como se mencionó en la introducción, no hay hasta el momento ningún trabajo al respecto. Así como una primera aproximación al problema, decidimos comenzar a estudiar el efecto de bloqueadores de canales de  $K^+$  sobre la entrada de nutrientes a las levaduras.

Como se muestra en la fig 18, la adición de TEA y 4-AP produjo una marcada inhibición del transporte de leucina y citrulina. Esto podría indicar que la salida de  $K^+$  que sigue a la entrada de estos compuestos [60, 121], se lleva a cabo por medio de canales, sin embargo dado que tanto el TEA como la 4-AP son compuestos aminados, no podemos descartar un efecto de competencia directo sobre las permeasas de aminoácidos. No obstante, cualquiera que sea el mecanismo de inhibición, este resultado (fig 18), se ve muy atrayente para su posterior desarrollo.

## PERSPECTIVAS

El presente trabajo constituye la primera caracterización que de canales de levaduras en bicapas lipídicas negras, de tal manera que en el sólo se abordaron cuestiones generales de las propiedades de estos canales, quedando así una amplia gama de preguntas sin contestar, y que deberán abordarse en estudios posteriores. Esto es aún más evidente si se toma en cuenta que también en los estudios de patch-clamp la caracterización que se ha hecho hasta el momento, ha sido muy general. Sin pretender hacer un listado exhaustivo, algunas posibilidades interesantes para estudios posteriores podrían ser:

i) Determinar si en efecto los canales de levaduras se encuentran agrupados en racimos en los que su "gating" no es independiente. Una forma de comenzar a abordar esta pregunta, podría ser la de agregar reactivos de grupos sulfidrilo a bicapas con incorporación múltiple de canales, y analizar el posible cambio cinético que se opere, como se ha hecho con el receptor de la acetilcolina.

ii) Los canales registrados precen ser solo ligeramente voltaje dependientes, por lo que resulta atrayente pensar en la posibilidad de otros mecanismos de modulación, como por ejemplo por fosforilación.

iii) Un aspecto que ayudaría mucho al estudio de los canales en bicapas planas, es el de obtener un medio que permita la incorporación de un sólo canal, de manera rutinaria.

iv) Un aspecto central para el conocimiento del tipo de canales que realmente presentan las levaduras, es el estudio detallado de su selectividad.

v) Cuando se trabaja con un organismo como las levaduras, una perspectiva siempre presente es la del estudio de mutantes, como lo demuestra los estudios que se han hecho con la mutante pmal.

vi) Una de las preguntas más importantes en relación con los canales de levaduras es la de cual es su función, en este sentido estudios del tipo presentado en la figura 18 pueden ser de gran utilidad.

## BIBLIOGRAFIA

- 1.- Akabas, M. H., Cohen, F. S. and Finkelstein, A. (1984) Separation of the osmotically driven fusion event from vesicle-planar membrane attachment in a model system for exocytosis. *J. Cell. Biol.* 98, 1063- 1071.
- 2.- Aldrich, R. W. and Yelen, G. (1983) Analysis of nonstationary channel kinetics in Single Channel Recording (Sakmann, B. and Neher, E. eds) *PLENUM. New York.*
- 3.- Alvarez, O., Benos, D. and Latorre, R (1985) The study of ionic channels in planar lipid bilayer membranes. *J. Electrophysiol. Tech.* 12, 159- 178.
- 4.- Alvarez, O. (1986) How to set up a bilayer system in Ion Channel Reconstitution (Miller, C. ed) *Plenum Press. New York.*
- 5.- Andersen, O. S., Green, W. N. and Urban, B. W. (1986). Ion conduction through sodium channels in planar lipid bilayers. in Ion Channel Reconstitution (Miller, C. ed) *Plenum Press. New York.*
- 6.- Armstrong, W. Mc. and Rothstein, A. (1964) Discrimination between alkali metal cations by yeast. *J. Gen. Physiol.* 48, 61- 77.
- 7.- Armstrong, C, M. (1975) Potassium pores of nerve and muscle membranes in *Membranes, Vol 3.* (G. Eisenman, ed). *Dekker. Inc. New York.*
- 8.- Armstrong, C. M (1971) Interaction of tetraethylammonium ion derivatives with the potassium channels of giant axons. *J. Gen. Physiol.* 58: 413- 437.

- 9.- Armstrong, C. M. and Taylor, S. R. (1980) Interaction of barium ions with potassium channels in squid giant axons. *Biophys. J.* 30, 473- 488.
- 10.- Armstrong, C. M., Swenson, R. P. and Taylor, S. R. (1982) Block of squid axon K channels by internally and externally applied barium ions. *J. Gen. Physiol.* 80, 663- 682.
- 11.- Armstrong, C. M., and Lopez-Barneo, J. (1987) External calcium ions are required for potassium channel gating in squid neurons. *Science.* 236, 712- 714.
- 12.- Bakker, R., Dobbblemann, J. and Borst-Pauwels, W. F. H. (1986) Membrane potential in the yeast *Endomyces magnusii* measured by microelectrodes and TPP<sup>+</sup> distribution. *Biochim. Biophys. Acta.* 861, 205- 209.
- 13.- Begenisich, T. and Smith, C. (1984) Multi-ion nature of potassium channels in squid axons. In Current Topics in Membranes and Transport. Vol 22 (Baker, P. F. ed) *Academic Press, New York.*
- 14.- Begenisich, T. (1988) The role of divalent cations in potassium channels. *Trends Neurosci.* 11, 270- 273.
- 15.- Benz, R. (1986) Analysis and chemical modification of bacterial porins in Ion Channel Reconstitution (Miller, C. ed). *PLENUM, New York.*
- 16.- Bezanilla, F. (1985) A high capacity data recording device based on a digital audio processor and a video cassette recorder. *Biophys. J.* 47, 437- 441.
- 17.- Borst-Pauwels, G. W. F. H. (1981) Ion transport in yeast. *Biochim. Biophys. Acta.* 650, 88- 127.

- 18.- Brunner, A., Carrasco, N. and Peña, A (1982) Correlation between resistance to ethidium bromide and changes in monovalent cation uptake in yeast. *Arch. Biochem. Biophys.* 267, 30- 36.
- 19.- Calahorra, M., Ramirez, J., Clemente, S. M. and Peña, A. (1987) Electrochemical potential and ion transport in vesicles of yeast plasma membrane. *Biochim. Biophys. Acta.* 899, 229- 238.
- 20.- Cohen, F. S., Zimmerberg, J. and Finkelstein, A. (1980) Fusion of phospholipid vesicles with planar phospholipid bilayers. II Incorporation of a vesicular membrane marker into the planar membrane. *J. Gen. Physiol.* 75: 251-270.
- 21.- Cohen, F. S., Akabas, M. H., Zimmerberg, J. and Finkelstein, A. (1984) Parameters affecting the fusion of unilamellar phospholipid vesicles with planar bilayer membranes. *J. Cell. Biol.* 98, 1054- 1062.
- 22.-Cohen, F. S. (1986) Fusion of liposomes to planar bilayers in Ion Channel Reconstitution (Miller, C. ed) *PLENUM, New York.*
- 23.- Colombini, M. (1986) Voltage gating in VDAC: Toward a molecular mechanism. in Ion Channel Reconstitution (Miller, C. ed) *PLENUM, New York.*
- 24.- Colquhoun, D. (1981) How fast do drugs work? *Trends. Pharmacol. Sci.* 2, 212- 217.
- 25.- Colquhoun, D. and Hawkes, A. G. (1983) The principles of the stochastic interpretation of ion-channel mechanisms. in Single-Channel Recording (Sakmann, B. and Neher, E. eds). *PLENUM, New York.*

- 26.- Colquhoun, D. (1987) A new type of ion-channel block. *Nature*. 329, 204- 205.
- 27.- Conway, E. J. and Duggan, F. (1958) A cation carrier in the yeast cell wall. *Biochem. J.* 69, 265- 274.
- 28.- Corey, P.D. (1983) Patch-clamp: current excitement in membrane physiology. *Neurosci. Comment.* 1: 99-110.
- 29.- Darszon, A. Guerrero, A., Liévano, A., González-Martínez, M. and Morales, E. (1988) Ionic channels in sea urchin sperm physiology. *News. Physiol. Sci.* 3, 181- 185.
- 30.- Darszon, A. (1986) Planar Bilayers: A powerful tool to study membrane proteins involved in ion transport. *Methods in Enzymology.* 127: 486- 502.
- 31.- De la Peña, P., Barros, F., Gascón, S, Ramos, S. and Lazo, P. S. (1982) The electrochemical proton gradient of *Saccharomyces*. *Eur. J. Biochem.* 123, 447- 453.
- 32.- Eisenberg, R. S. (1990) Channels as enzymes. *J. Membrane. Biol.* 115, 1- 12.
- 33.- Ehrenstein, G., Latorre, R. and Lecar, H. (1974) Kinetics of the opening and closing of individual excitability-inducing material. *J. Gen. Physiol.* 63, 707- 721.
- 34.- Eisenman, G. and Horn, R. (1983) Ionic selectivity revisited: The role of kinetic and equilibrium processes in ion permeability through channels. *J. Membrane. Biol.* 76, 197- 225.
- 35.- Ehrlich, B. E., Finkelstein, A., Forte, M. and Kung, C. (1984) Voltage dependent calcium channels from *Paramecium* cilia incorporated into planar lipid bilayers. *Science.* 225, 427- 429.

- 36.- Finkelstein, A. (1974) Bilayers: Formation, Measurements, and Incorporation of components in *Methods in Enzymology* 32: 489-501.
- 37.- Finkelstein, A. (1976) Water and nonelectrolyte permeability of lipid bilayer membranes. *J. Gen. Physiol.* 68, 127-135.
- 38.- Finkelstein, A. (1980) The nonelectrolyte permeability of planar lipid bilayer membranes. *J. Gen. Physiol.* 75, 427-435.
- 39.- Fox, J. A. (1987) Ion channel subconductance states. *J. Membrane Biol.* 97, 1-8.
- 40.- Franzusoff, A. J. and Cirillo, V. P. (1983) Glucose transport activity in isolated plasma membrane from *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 258, 3608-3614.
- 41.- Geletyuk, V. I. and Kazachenko, V. N. (1985) Single  $Cl^-$  channels in molluscan neurones: multiplicity of the conductance states. *J. Membrane Biol.* 86, 9-15.
- 42.- Goffeau, A. and Slayman, W. C. (1981) The proton translocating ATPase of the fungi plasma membrane. *Biochim. Biophys. Acta.* 639, 197-223.
- 43.- Gómez-Lagunas, F., Peña, A., Liévano, A. and Darszon, A. (1988)  $K^+$  Channels from yeast plasma membranes incorporated in black lipid membranes. *Biophys. J.* 53, 552a.
- 44.- Gómez-Lagunas, F., Peña, A. and Darszon, A. (1989) Yeast ion channels. Selectivity and inhibition of nutrient uptake by  $K^+$  channel blockers. *Biophys. J.* 55, 544a.
- 45.- Gómez-Lagunas, F., Peña, A., Liévano, A. and Darszon, A. (1989) Incorporation of ionic channels from yeast plasma membranes into black lipid membranes. *Biophys. J.* 56, 115-

119.

- 46.- Gustin, M. C., Martinac, B., Saimi, Y., Culbertson, M. R. and Kung, C. (1986) Ion channels in yeast. *Science*. 233, 1195-1197.
- 47.- Gustin, M. C., Xin-Liang, Z., Martinac, B. and Kung, C. (1988) A mechanosensitive ion channel in the yeast plasma membrane. *Science*. 242, 762-765.
- 48.- Hanke, W., Methfessel, C., Wilmsen, U. and Boehm, G (1984) Ion channel reconstitution into lipid bilayer membranes on glass patch pipettes. *Bioelectrochemistry and Bioenergetics*. 12: 329-339.
- 49.- Hartshorne, R., Tamkun, M. and Montal, M. (1986) The reconstituted sodium channel from brain in Ion Channel Reconstitution (Miller, C. ed). *PLENUM, New York*.
- 50.- Hamill, O. P., Marty, A., Neher, E., Sakmann, B. and Sigworth, F. J. (1981) Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflügers Arch*. 391: 85-100.
- 51.- Hartung, K., Grell, E., Hasselbach, W. and Bamberg, E (1987) Electrical pump currents generated by the  $Ca^{2+}$ -ATPase of sarcoplasmic reticulum vesicles adsorbed on black lipid membranes. *Biochim. Biophys. Acta*. 900: 209-220.
- 52.- Hille, B. (1984) *Ionic Channels of Excitable Membranes, Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts*.
- 53.- Hille, B. (1975) Ionic selectivity of Na and K channels of nerve membranes. in *Membranes, Vol 3 (Eisenman, G. ed) Dekker, Inc. New York*.



- 54.- Hille, B. and Schwarz, W. (1978) Potassium channels as multi-ion single-file pores. *J. Gen. Physiol.* 72, 409- 442.
- 55.- Hodgkin, A. L., and Katz, B. (1949) The effect of sodium ions on the electrical activity of the giant axon of the squid. *J. Physiol.* 108: 37- 77.
- 56.- Hodgkin, A. L., and Huxley, A. F. (1952) Currents carried by sodium and potassium ions through the membrane of the giant axon of *Loligo*. *J. Physiol* 116: 449- 472.
- 57.- Hodgkin, A. L., and Huxley, A. F. (1952) The components of the membrane conductance in *Loligo*. *J. Physiol.* 116: 473- 496.
- 58.- Hodgkin, A. L., and Huxley, A. F. (1952) The dual effect of membrane potential on sodium conductance in the giant axon of *Loligo*. *J. Physiol* 116: 497- 506.
- 59.- Hodgkin, A. L., and Huxley, A. F. (1952) A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. *J. Physiol* 117: 500- 544.
- 60.- Horák, J. (1986) Amino acid transport in eucaryotic microorganisms. *Biochim. Biophys. Acta.* 864, 223- 256.
- 61.- Hunter, M. and Giebisch, G. (1987) Multi-barrelled K channels in renal tubules. *Nature.* 327, 522- 524.
- 62.- Höfer, M. and Novacky, A. (1986) Measurement of plasma membrane potentials of yeast cells with glass microelectrodes. *Biochim. Biophys. Acta.* 862, 372- 378.
- 63.- Höfer, M., Huh, H. and Kunemund, A (1983) Membrane potential and cation permeability. A study with a nystatin-resistant mutant of *Rhodotorula gracilis* (*Rhodosporidium toruloides*). *Biochim. Biophys. Acta.* 735, 211- 214.

- 64.- Höfer, M. and Künemund, A. (1984) Tetraphenylphosphonium ion is a true indicator of negative plasma-membrane potential in the yeast *Rhodotorula glutinis*. *Biochem. J.* 225, 815- 819.
- 65.- Isacoff, E. Y., Jan, Y. N. and Jan, L. Y. (1990) Evidence for the formation of heteromultimeric potassium channels in *Xenopus* oocytes. *Nature.* 345, 530- 534.
- 66.- Iverson, L. E., Tanouye, M. A., Lester, H. A., Davidson, N. and Rudy, A. (1988) A<sup>-</sup> type potassium channels expressed from *Shaker* locus cDNA. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 85, 5723- 5727.
- 67.- Kazachenko, V. N. and Geletyuk, V. I. (1984) The potential dependent K<sup>+</sup> channel in molluscan neurones is organized in a cluster of elementary channels. *Biochim. Biophys. Acta.* 773, 132- 142.
- 68.- Kotyk, A., Horak, J. and Knotkova, A. (1982) Transport protein synthesis in non-growing yeast cells. *Biochim. Biophys. Acta.* 698, 243- 251.
- 69.- Krasne, S. (1980) Ion selectivity in membrane permeation in Membrane Physiology (Andreoli, T. E., Hoffman, J. F. and Fanestil, D. D. eds) *PLENUM MEDICAL. New York.*
- 70.- Krouse, M. E., Schneider, G. T. and Gage, P. W (1986) A large anion selective channel has seven conductance levels. *Nature.* 319, 58- 60.
- 71.- Latorre, R. and Alvarez, O. (1981) Voltage-dependent channels in planar lipid bilayer membranes. *Physiol. Revs.* 61, 77- 150.
- 72.- Latorre, R. and Miller, C. (1983) Conduction and selectivity in potassium channels. *J. Membrane. Biol.* 71, 11- 30.
- 73.- Latorre, R. (1986) The large calcium-activated potassium

- channel. in *Ion Channel Reconstitution* (Miller, C. ed) Plenum, New York.
- 74.- Lewis, R. S. and Cahalan, M. D. (1988) The plasticity of ion channels: parallels between the nervous and immune systems. *Trends Neurosci.* 11, 214- 218.
- 75.- Liévano, A., Vega-SaenzDeMiera, E. C. and Darszon, A. (1990)  $Ca^{2+}$  channels from the sea urchin sperm plasma membrane. *J. Gen. Physiol.* 95, 273- 296.
- 76.- Luger, P. (1980) Kinetic properties of ion carriers and channels. *J. Membrane Biol.* 57, 163- 178.
- 77.- Mannella, A. C., Colombini, M. and Frank, J. (1983) Structural and functional evidence for multiple channel complexes in the outer membrane of *Neurospora crassa* mitochondria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 80, 2243- 247.
- 78.- Malpartida, F. and Serrano, R. (1980) Reconstitution of the proton-translocating adenosine triphosphatase of yeast plasma membranes. *J. Biol. Chem.* 256, 4175- 4177.
- 79.- Malpartida, F. and Serrano, R (1981) Proton translocation catalyzed by the purified yeast plasma membrane ATPase.
- 80.- Martinac, B., Buechner, A. H., Delcour, J. A. and Kung, C (1987) Pressure-sensitive ion channel in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 84, 2297- 2301.
- 81.- Matteson, D. R. and Swenson, R. P. (1986) External monovalent cations that impede the closing of K channels. *J. Gen. Physiol.* 87, 795- 816.
- 82.- Mauro, A., Blake, M. and Labarca, P (1988) Voltage gating of conductance in lipid bilayers induced by porin from outer

- membrane of *Nisseria gonorrhoeae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 85, 1071- 1075.
- 83.- Miller, C. (1983) Integral membrane channels: Studies in model membranes. *Physiol. Reus.* 63, 1209- 1242.
- 84.- Miller, C. (1987) Trapping single ions inside single ion channels. *Biophys. J.* 52, 123- 126.
- 85.- Miller, C., Latorre, R. and Reisin, I. (1987) Coupling of voltage-dependent gating and  $Ba^{++}$  block in the high-conductance  $Ca^{++}$  activated  $K^+$  channel. *J. Gen. Physiol.* 90, 427- 449.
- 86.- Meves, H. (1984) Hodgkin- Huxley: Thirty years after in *Current Topics in Membranes and Transport*. Vol 22 (Baker, P. F. ed) *Academic Press, New York.*
- 87.- Meves, H. and Nagy, K. (1989) Multiple conductance states of the sodium channel and other ion channels. *Biochim. Biophys. Acta.* 988, 99- 105.
- 88.- Moczydlowski, E. (1986). Single channel enzymology, in *Ion Channel Reconstitution* (C. Miller, ed), *Plenum Press, New York.*
- 89.- Moczydlowski, E., Uehara, A. and Sherwood, H. 1986. Blocking pharmacology of Batrachotoxin-activated sodium channels. in *Ion Channel Reconstitution* (C. Miller, ed), *Plenum Press, New York.*
- 90.- Montal, M. (1974) Formation of bimolecular membranes from lipid monolayers in *Methods in Enzymology* 32: 545- 554.
- 91.- Montal, M., and Mueller, P. (1972) Formation of bimolecular membranes from lipid monolayers and a study of their

- electrical properties. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 69: 3561-3566.
- 92.- Montal, M., Anholt, R. and Labarca, P (1986) The reconstituted acetylcholine receptor. in *Ion Channel Reconstitution* (C. Miller, ed), pp 157- 204, *Plenum Press, New York.*
- 93.- Moran, N., Ehrenstein, G., Iwasa, K., Bare, C. and Mischke, C. (1984) Ion channels in plasmalemma of wheat protoplasts. *Science.* 226, 835- 838.
- 94.- Moran, N., Ehrenstein, G., Iwasa, K., Bare, C. and Mischke, C. (1986) Ionic channels in plant protoplasts in *Ion channels in cells and model systems.* (Latorre, R. ed). *PLENUM, New York.*
- 95.- Müller, P. and Rudin, D. O. (1969) Bimolecular lipid membranes: Techniques of formation, study of electrical properties, and induction of ionic gating phenomena. in *Laboratory Techniques in Membrane Biophysics.* (Passow, H. and Stämpfli, R. eds) *Springer-Verlag, Berlin.*
- 96.- Ohmori, H., Yoshida, S. and Hawigara, S. (1981) Single K<sup>+</sup> channel currents of anomalous rectification in cultured rat myotubes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 78, 4960- 4964.
- 97.- Ongjoco, R., Szkutnika, K. and Cirillo, V (1987) Glucose transport in vesicles reconstituted from *Saccharomyces cerevisiae* membranes and liposomes. *J. Bacteriol.* 169, 2926- 2931.
- 98.- Peña, A. (1976) The proton pump in the yeast cell membrane. in *Mitochondria* (Packer, L and Gómez-Poyou, A. eds) *Academic*

Press. New York.

- 99.- Peña, A., Cinco, G., Gómez-Puyou, A. and Tuena, M. (1972) Effect of the pH of the incubation medium on glycolysis and respiration in *Sacharomyces cerevisiae*. *Arch. Biochem. Biophys.* 153, 413- 425.
- 100.- Peña, A. (1969) Studies on the mechanism of stimulation of glycolysis and respiration by  $K^+$  in *Sacharomyces cerevisiae*. *Biochim. Biophys. Acta.* 180, 1- 8.
- 101.- Peña, A. (1975) Studies on the mechanism of  $K^+$  transport in yeast. *Arch. Biochem. Biophys.* 167, 397- 409.
- 102.- Peña, A. (1973) Studies with guanidines on the mechanism of  $K^+$  transport in yeast. *FEBS Letters.* 34, 117- 119.
- 103.- Peña, A. and Ramirez, G. (1975) Interaction of ethidium bromide with the transport system for monovalent cations in yeast.
- 104.- Peña, A., Uribe, S., Pardo, J. P., Borbolla, M. (1984) The use of a cyanine dye in measuring membrane potential in yeast. *Arch. Biochem. Biophys.* 231, 217- 225.
- 105.- Prod'hom, B., Pietrobon, D. and Hess, P. (1987) Direct measurement of proton transfer rates to group controlling the dihydropyridine-sensitive  $Ca^{2+}$  channel. *Nature.* 329, 243- 246.
- 106.- Premark, B. A., Thompson, S. and Coombs-Hahn, J. (1989) Clustered distribution and variability in kinetics of transient  $K$ -channels in molluscan neuron cell bodies. *J. Neurosci.* 9, 4089- 4099.
- 107.- Ramirez, A. J., Vacata, V., McCusker, J. H., Haber, J. E.,

- Mortimer, R. K., Owen, W. G. and Lecar, H. (1989) ATP-sensitive  $K^+$  channels in a plasma membrane  $H^+$ -ATPase mutant of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 86: 7866- 7870.
- 108.- Ramos, J. (1985) A potassium transport mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch. Microbiol.* 143, 88- 93.
- 109.- Rauch, G., Gambale, F. and Montal, M (1990) Tetanus toxin channel in phosphatidylserine planar bilayers: conductance states and pH dependence. *Eur. Biophys. J.* 18, 79- 83.
- 110.- Rodriguez-Navarro, A. and Ramos, J. (1984) Dual system for potassium transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* 159, 940- 945.
- 111.- Rodriguez-Navarro, A. (1985) in Proceedings of contributions to the 3<sup>rd</sup> small meeting on yeast transport and energetics. *Mook. The Netherlands. August. 21- 23.*
- 112.- Rodriguez-Navarro, A., Blatt, M. R. and Slayman, C. L. (1986) A potassium-proton symport in *Neurospora crassa*. *J. Gen. Physiol.* 87, 649- 674.
- 113.- Ruppertsberg, J. P., Schröter, K. H., Sakmann, B., Stocker, M., Sewing, S. and Pongs, O (1990) Heteromultimeric channels formed by rat brain potassium-channel proteins. *Nature.* 345, 535- 537.
- 114.- Rudy, B. (1988) Diversity and ubiquity of  $K^+$  channels. *Neuroscience.* 25, 729- 749.
- 115.- Sachs, F. (1983) Is the acetylcholine receptor a unit-conductance channel? in *Single-Channel Recording* (Sakmann, B. and Neher, E. eds). *Plenum Press, New York.*

- 116.- Saimi, Y., Martinac, B., Gustin, M. C., Culbertson, M. R., Adler, J. and Kung, C (1988) Ion channels in *Paramecium*, yeast and *Escherichia coli*. *TIBS*. 13, 304- 309.
- 117.- Salkoff, L. B. and Wyman, R. J. (1983) Ion currents in *Drosophila* flight muscles. *J. Physiol.* 337, 687- 709.
- 118.- Schein, S. J., Colombini, M. and Finkelstein, A. (1976) Reconstitution in planar lipid bilayers of a voltage-dependent anion-selective channel obtained from *Paramecium* mitochondria. *J. Membrane Biol.* 30, 99- 120.
- 119.- Schindler, H., Spillecke, F. and Neumann, E (1984) Different channel properties of *Torpedo* acetylcholine receptor monomers and dimers reconstituted in planar membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 81, 6222- 6226.
- 120.- Schindler, H. (1980) Formation of planar bilayers from artificial or native membrane vesicles. *FEBS Lett.* 122: 77-79.
- 121.- Seaston, A. Inkson, C. and Eddy, A. A. (1973) The absorption of protons with specific amino acids and carbohydrates by yeast. *Biochem. J.* 134, 1031- 1043.
- 122.- Serrano, R. (1985) Plasma membrane ATPase of plants and fungi. *CRC. Press. Florida.*
- 123.- Serrano, R. (1980) Effect of ATPase inhibitors on the proton pump of respiratory deficient yeast. *Eur. J. Biochem.* 105, 419- 424.
- 124.- Segel, I. H. (1975) Biochemical calculations. *John Wiley & Sons, New York.*
- 125.- Shuster, M. J. and Siegelbaum, S. A. (1987) Pharmacological characterization of the serotonin-sensitive potassium channel



- of *Aplysia* sensory neurons. *J. Gen. Physiol.* 90, 587- 608.
- 126.- Singer, S. J., and Nicolson, G. L. (1972) The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science.* 175: 720-731.
- 127.- Stein, W. D. (1984) Transport and Diffusion across Cell Membranes. *Academic Press. New York.*
- 128.- Stevens, C. F. (1984) Inferences about molecular mechanisms through fluctuation analysis in Membrane channels and noise (Eisenberg, R. S., Frank, M. and Stevens, C. E. eds) *Plenum Press. New York.*
- 129.- Suarez-Isla, A. B., Wan, K., Lindstrom, J. and Montal, M. (1983) Single-channel recordings from purified Acetylcholine receptors reconstituted in bilayers formed at the tip of patch pipets. *Biochemistry.* 22: 2319-2323.
- 130.- Tanford, C. (1980) The Hydrophobic Effect. Formation of Micelles and Biological Membranes. *Wiley Interscience. New York.*
- 131.- Tanifuji, M., Sato, M., Wada, Y, Anraku, Y. and Kasai, M. (1988) Gating behaviors of a voltage dependent and  $Ca^{2+}$ -activated cation channel of yeast vacuolar membrane incorporated into planar lipid bilayer. *J. Membrane Biol.* 106, 47- 55.
- 132.- Tedeschi, H., Manella, C. A. and Bowman, C. L (1987) Patch clamping the outer mitochondrial membrane. *J. Membrane Biol.* 97, 21- 29.
- 133.- Thompson, S. H. (1977) Three pharmacologically distinct potassium channels in molluscan neurones. *J. Physiol.* 265, 465- 488.

- 134.- Vergara, C. and Latorre, R. (1983) Kinetics of  $\text{Ca}^{2+}$  activated  $\text{K}^+$  channels from rabbit muscle incorporated into planar bilayers. *J. Gen. Physiol.* 82, 543- 568.
- 135.- Vergara, C., Moczydlowski, E. and Latorre, R. (1984) Conduction, blockade and gating in a  $\text{Ca}^{2+}$ -activated  $\text{K}^+$  channel incorporated into planar lipid bilayers. *Biophys. J.* 45, 73- 76
- 136.- Villalobo, A. (1982) Potassium transport coupled to ATP hydrolysis in reconstituted proteoliposomes of yeast plasma membrane ATPase. *J. Biol. Chem.* 257, 1824- 1828.
- 137.- Villalobo, A. (1984) Energy-dependent  $\text{H}^+$  and  $\text{K}^+$  translocation by reconstituted yeast plasma membrane ATPase. *Can. J. Biochem. Cell. Biol.* 62, 865- 877.
- 138.- Wada, Y., Ohsumi, Y., Tanifuji, M., Kasai, M. and Anraku, Y (1987) Vacuolar ion channel of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 262, 17260- 17263.
- 139.- Wagoner, P. K. and Oxford, G. S. (1987) Cation permeation through the voltage dependent potassium channel in the squid axon. *J. Gen. Physiol.* 90, 261- 290.
- 140 .- White, H. S. (1986) The Physical nature of planar bilayer membranes in Ion Channel Reconstitution (C. Miller, ed), pp 3-36, *Plenum Press, New York*.
- 141.- Yellen, G. (1987) Permeation in potassium channels. Implications for channel structure. *Ann. Rev. Biophys. Biophys. Chem.* 16, 227- 246.
- 142.-Zimmerberg, J., Cohen, F. S. and Finkelstein, A. (1980) Fusion of phospholipid vesicles with planar phospholipid

bilayer membranes. I Discharge of vesicular contents across  
the planar membrane. *J. Gen. Physiol.* 75: 241- 250.

- 143.- Zoratti, M. and Petronilli, V. (1988) Ion-conducting channels  
in a gram-positive bacterium. *FEBS. Lett.* 240, 105- 109.

# Incorporation of ionic channels from yeast plasma membranes into black lipid membranes

F. Gómez-Lagunas,\* A. Peña,\* A. Liévano,<sup>†</sup> and A. Darszon<sup>‡</sup>

\*Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, México, D. F.; <sup>†</sup>Centro de Investigación y de Estudios Avanzados, Instituto Politécnico Nacional, 07000 México, D. F., México

**ABSTRACT** Recently, patch-clamping of yeast protoplasts has revealed the presence of plasma membrane K<sup>+</sup> channels (Gustin, M. C., B. Martinac, Y. Saimi, M. R. Culbertson, and C. Kung 1986 *Science (Wash DC)* 233: 1195-

1197) In this work we show that fusion of purified plasma membranes into planar bilayers allows the study of the yeast channels. The main cationic conductances detected were of 64 and 116 pS, however, larger and smaller

conductances have been observed. The two main conductances were sensitive to the K<sup>+</sup> channels blockers tetraethylammonium (TEA<sup>+</sup>) and Ba<sup>2+</sup>. Biotin experiments indicated that both conductances were K<sup>+</sup> selective.

## INTRODUCTION

Ionic channels play a major role in the ionic permeability of biological membranes, and are present in all cells tested so far. In yeast, the membrane potential is set by a H<sup>+</sup>-ATPase (1, 2), and K<sup>+</sup> ions participate in its regulation (2, 3). For some time it has been known that K<sup>+</sup> movements through the yeast plasma membrane occur by means of two K<sup>+</sup> carriers (4, 5) whose activity depends on an adequate cellular energy supply. In addition, patch-clamping of yeast protoplasts has recently revealed the presence of K<sup>+</sup>-selective depolarization-activated channels (6), ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels (7), and pressure-sensitive channels (8, 9).

With the purpose of extending the study of the yeast plasma membrane channels, we have begun a series of studies at a physiological level by measuring ion fluxes in intact cells and recording channel activity in model membrane systems. Here, we report the incorporation of K<sup>+</sup> channels from plasma membrane fragments of yeast into black lipid membranes by the fusion method (10). Part of this work has been presented in abstract form (11, 12).

## MATERIALS AND METHODS

Plasma membrane fragments from a commercially obtained wild type strain of *Saccharomyces cerevisiae* (La Azteca S. A., Mexico City), and the wild type strain NT3000.3A were prepared as previously described (13) by a modification of the method of Franzusoff and Cirillo (14). This plasma membrane preparation shows approximately a 10% contamination by mitochondrial membranes as assessed by measurements of the sensitivity of ATPase activities to the inhibitors vanadate and oligomycin, previously reported from our laboratory (13). No vacuolar contamination was detected, because all ATPase activity was sensitive either to vanadate or oligomycin.

Black lipid membranes were formed from a 20 mg/ml solution of

PE/PS 1:1, or diphytanoyl phosphatidyl choline (DiphyPC) (Avanti Polar Lipids, Birmingham, AL) in *n*-decane on a 0.2-0.25-mm diameter hole in a Saran Wrap plastic partition separating two Teflon compartments, each of ~0.5 ml capacity, by the technique of Müller and Rudin (15). Unless otherwise indicated, the *trans* side electrolyte solution contained 100 mM KCl, 0.1 mM CaCl<sub>2</sub>, and 10 mM Hepes-KOH, pH 8.0; the *cis* side solution was the same, except that the KCl concentration was 300 mM. In the biotinic experiments the *cis* side solution was replaced by 300 mM NaCl, 0.1 mM CaCl<sub>2</sub>, and 10 mM Hepes-NaOH, pH 8.0. Channel incorporation was observed after the addition of 9-90 µg protein/ml to the *cis* side of the bilayer. All experiments were done at 20-22°C.

Voltage pulses were applied with a stimulator (model SD9; Grass Instrument Co., Quincy, MA) to the *cis* side. Single channel currents were measured under voltage clamping with a current to voltage converter with a 10 GΩ resistor in the feedback loop, at a bandwidth of 1 KHz. The current output of the converter was stored in a modified digital audio processor connected to a VCR (16, 17).

Unless otherwise indicated, recordings were filtered at 800 Hz (-3db point, eight-pole Bessel filter, model 744PL-3, Frequency Devices Inc., Haverhill, MA), and digitized at 2 KHz. Channel analysis was performed with the *p*-clamp 4.0 program, in the semiautomatic mode. Transitions lasting < 4 digital points were discarded by the program for constructing the amplitude histograms. All reagents were of analytical grade. Solutions were filtered with 0.22-µm filters (Millipore/Continental Water Systems, Bedford, MA). The data for this work were obtained from 25 h of recordings from 81 bilayers.

## RESULTS AND DISCUSSION

Before adding the yeast plasma membranes to the *cis* compartment, we routinely applied a control pulse of ± 100 mV to the lipid bilayer. Membranes showing noise were discarded, and the chamber was washed again. After the control pulse, plasma membranes sonicated in 700 mM sucrose were added, and usually channel currents were observed within 1-90 min.

Current fluctuations at three positive voltages in PE/

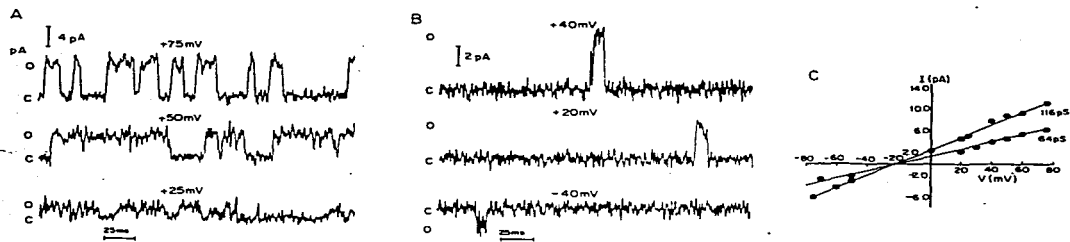


FIGURE 1 (A) Current records of a 64-pS channel in a PE/PS bilayer. The solutions were 300 mM KCl, 0.1 mM CaCl<sub>2</sub>, 10 mM Hepes-KOH, pH 8.0, *cis*; and 100 mM KCl, 0.1 mM CaCl<sub>2</sub>, 10 mM Hepes-KOH, *trans*. No activity was detected at *cis*-negative voltages. (B) Records from a bilayer in which the 116-pS channel was incorporated. Activity could be seen at both positive and negative voltages. Conditions were the same as in A. (C) I-V plots from data as in A and B. Each point represents the average of the transitions obtained from four bilayers. Standard deviations did not exceed 10% of the average values.

PS membranes are shown in Fig. 1 A. The currents most likely originate from the activity of plasma membrane channels, and not from channels coming from membranes of intracellular origin. This assumption is based on the degree of purity of the membrane preparations (see Materials and Methods). On the other hand, the only channels which have been described in yeast are from

plasma membrane origin (see below) and a 435-pS cationic channel from the tonoplast. This later channel requires millimolar Ca<sup>2+</sup> to be active (18), which excludes its detection under our conditions. In the experiment illustrated in Fig. 1 A, the single channel activity was only observed at positive voltages. This behavior is consistent with that observed in patch clamped protoplasts (6), in

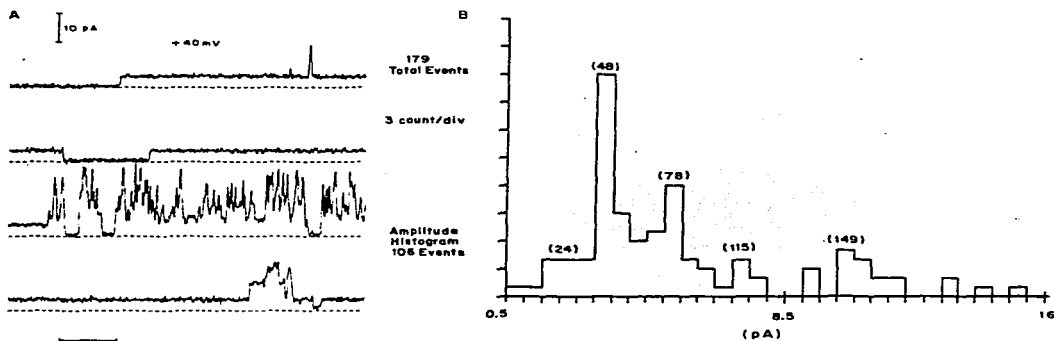


FIGURE 2 Appearance of several current levels after fusion of plasma membrane vesicles into a PE/PS bilayer. Experimental conditions were as in Fig. 1. (A) Current fluctuations at 40 mV. Traces are not consecutive; they were chosen to exemplify the appearance of several current amplitudes. Note the burstlike behavior in the third trace from top to bottom. (B) Current amplitude histogram of the record in A. Histogram peaks are marked with their corresponding conductances. Note the existence of several conductance levels yielding a skewed distribution.

which only depolarizing voltages elicited currents. Nevertheless, in many bilayers it was possible to record currents at both positive and negative voltages, which allowed us to construct more complete I-V curves, as shown in Fig. 1 C. Asymmetric voltage responses of yeast channels seemed to be dependent on the lipid composition of the planar bilayers (see below).

Two main conductances of 64 and 116 pS were obtained from the slope of the curves in Fig. 1 C. These conductance values are close to those found for pressure-sensitive channels (40 and 75 pS) that are present in yeast protoplasts (8, 9). Because little is known about the yeast pressure-sensitive channels, we cannot compare them yet with our data. The differences between the conductances we found and those reported in patch-clamp studies of yeast protoplasts for K<sup>+</sup> channels (13 pS [6] and 17 pS [7]) could have several explanations. (a) In the patch-clamp study (6) the solutions employed were at pH 7.2, and in this study we initially choose to work at pH 8.0. This choice was made because studies with intact cells carried out in our laboratory have shown that K<sup>+</sup> efflux is greater at pH 8.0 than at lower pH values (unpublished observations), and there are reports of K<sup>+</sup> currents that are reduced very steeply by lowering the pH from 8.0 to 5.0 (19). (b) The difference between the conductance values could also be due to variations in the growth conditions employed. Experimental conditions are known to have striking effects on the properties of yeast transport systems (20). (c) It is possible that in the bilayer experiments some channel modifications can occur during membrane purification. (d) The selective incorporation of high-conductance channels into the bilayers. In this respect, it must be mentioned that in general, regardless of the amount of protein added to the *cis* compartment, several conductance levels were observed in each experiment. This rather common phenomenon is exemplified in Fig. 2 A. The amplitude histogram (Fig. 2 B) shows that in this bilayer, the 116 pS conductance was found along with other conductances less frequently incorporated in other experiments. The point is further documented in

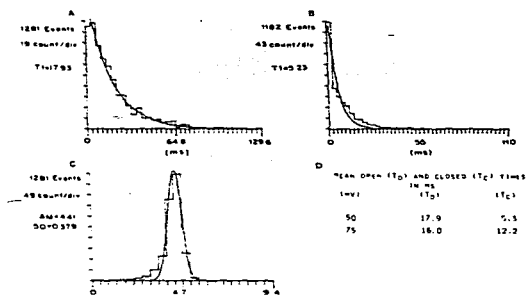


FIGURE 3 Kinetic behavior of a single 64-pS channel. Experimental conditions are the same as in Fig. 1. (A) Open dwell-time histogram. (B) Closed dwell-time histogram. Both the open and closed histograms were adjusted with a single exponential. (C) Current amplitude histogram of the record at 50 mV. (D) Mean open and closed times at two voltages calculated from the time constants of histograms, as in A and B.

Table 1. In many bilayers we have observed that the channel activity appears in bursts, as shown in the third trace of Fig. 2 A.

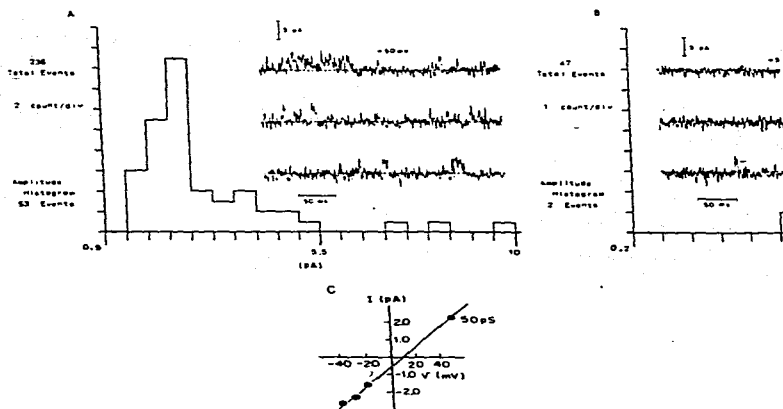
Because of the multiple conductance levels observed in each experiment, the kinetic analysis has been difficult to perform. However, in one experiment in which the only channel present was one of 64 pS, the open and closed dwell time histograms were adjusted with a single exponential, suggesting that there was only one open and one closed state, as shown in Fig. 3, A-C. The mean open and closed times for two voltages, given in Fig. 3 D, suggest that the channel is voltage dependent.

From the data on Fig. 1 C, a reversal potential of -22 mV was obtained for both the 64- and 116-pS conduc-

TABLE 1 Statistical information of channel records

PE/PS bilayers			DiphyPC bilayers		
Conductance	Reversal potential in 3:1 KCl gradient	% of bilayers	Conductance	Reversal potential in symmetrical KCl	% of bilayers
pS	mV		pS	mV	
65.3 ± 4.0	-21.4 ± 4.6	71.0	65.0 ± 4.0	-0.8 ± 3.7	60.0
112.0 ± 6.5	-21.8 ± 1.3	57.1	100.0 ± 9.3	-1.3 ± 1.6	80.0
41 ± 9.9	-22.6 ± 0	29.0	100.0 ± 9.3	-1.3 ± 1.6	80.0
170 ± 6.4	-21.6 ± 2.3	29.0	156.0 ± 8.5	0.9 ± 0.5	29.0
327 ± 19.0	-16.0 ± 9.1	29.0			

Conductances and reversal potentials were obtained from I-V plots from five to seven bilayers.



**FIGURE 4** Channel behavior under biionic conditions in a DiphyPC bilayer. (A) Current transitions at 50 mV in the presence of the control 300 mM KCl buffers on both sides of the bilayer. The record was digitized at 2 KHz and filtered at 1 KHz. The analysis was performed with the pClamp 5.0 program in the semiautomatic mode. The amplitude histogram did not consider events with an open dwell time  $\leq 4$  digital points. A total of 236 events was taken from 45 s of record, and from these, a total of 53 were used to construct the histogram. (B) Current transitions at 50 mV from the same bilayer after the *cis* solution was replaced by a 300-mM NaCl buffer (see Material and Methods). Note that only 47 events were taken from 90 s of record, and from these only two were used by the program to construct the histogram. (That is, from a sample twice as long, there was a 96% reduction in the amount of events.) One of the two openings is shown in the trace. (C) I-V plot from data as in B. In this bilayer the slope conductance was 53 pS. A reversal potential of 11 mV was obtained taking into account the few openings seen at positive voltages and assuming a linear relation. Permeability ratios were calculated from the reversal potentials of three bilayers as in C, with the Goldman equation. An average of  $(P_{K^+})/(P_{Na^+}) = 2.0$  was obtained.

tances (see also Table 1). The close correspondence between the measured reversal potentials and the theoretically expected Nernst potential for  $K^+$  ( $-27$  mV) indicates that the channels are cation selective. In two PE/PS bilayers, 10 mM TEA decreased the 64- and 116-pS slope conductances by an average 40%.  $BaCl_2$  at 10 mM decreased the 64-pS conductance by 60% in one bilayer, and in two others, its addition at 16 and 75 mM markedly decreased the slope conductance of the incorporated channels. These results are consistent with  $K^+$  channel characteristics. The presence of  $K^+$ -selective channels was first suggested in the patch-clamp study (6), where it was found that  $Na^+$  was conducted poorly through the recorded channels. These results are consistent with the well-known high permeability to  $K^+$  of the yeast plasma membrane (3).

To obtain further information about selectivity, we incorporated the channels into neutral bilayers formed with the synthetic lipid DiphyPC, which avoids uncertainties arising from surface potential effects. Two main

conductances of 65 and 100 pS were obtained both in experiments performed under symmetric 300 mM KCl and using the usual 3:1 KCl gradient, as in the PE/PS experiments (not shown). The  $Na^+/K^+$  permeability ratio was studied under biionic conditions (300 mM NaCl *cis*/300 mM KCl *trans*, see Fig. 4) and by measuring the change in the reversal potential produced by adding NaCl to the *cis* or *trans* side of bilayers containing the control KCl solutions. As shown in Fig. 4, replacement of *cis*  $K^+$  for  $Na^+$  always produced a marked decrease in the frequency of channel openings at *cis*-positive voltages (four bilayers). This result suggests that the incorporated yeast channels discriminate between  $Na^+$  and  $K^+$ . However, as we always had to deal with several current amplitudes, in order to get some information about the relative permeabilities, it was assumed that the channels did not rectify, and the few positive-voltage transitions were taken into account. In this way, from data of three bilayers as that of Fig. 4 C, a minimum selectivity for  $K^+$  consistent with a  $(P_{K^+})/(P_{Na^+}) = 2$  was obtained for a

51-pS conductance. At this moment we cannot establish whether this conductance corresponds to the 65- or 100-pS transitions found in the control records. Finally, it must be mentioned that the assumption made to get an estimate of the permeability ratios has been previously used by other groups dealing with several conductance systems (21).

The main conductances found in DiphyPC bilayers (65 and 100 pS) were almost identical to those most commonly found in PE/PS bilayers. This result could indicate that the mouths of these channels are at a distance from the membrane interface, such that ionic concentrations near them are unaffected by the surface potential. However, further studies are needed before anything can be said concerning surface potential effects on conductance or channel gating. The two most frequent conductances found were sometimes incorporated into bilayers independently of each other. This point, along with the fact that under biionic conditions we only identified one clear conductance, suggests that the two conductances belong to different channels rather than to different substates of a single channel. Finally, it is worth mentioning that the asymmetric voltage response mentioned in relation to Fig. 1, has not been detected in neutral DiphyPC bilayers. Whether this indicates a selective incorporation of the channels or a lipid-induced behavior cannot be ascertained at this moment.

Incorporation of channels in model membranes has proved to be useful in the characterization of channels from cells and membrane sites not accessible to electrophysiological techniques. The yeast plasma membrane presents energy-dependent  $K^+$  carriers along with  $K^+$  and pressure-sensitive channels which endow these cells with a high potassium permeability (4-9). The present work shows that the recently described yeast plasma membrane channels (6, 9) are amenable to be studied in planar bilayers.

We thank Ezequiel Morales for his help.

This study was supported by grants from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, the Organization of American States, and the World Health Organization.

Received for publication 9 May 1988 and in final form 14 March 1989.

## REFERENCES

- Goffeau, A., and C. W. Slayman. 1981. The proton-translocating ATPase of the fungal plasma membrane. *Biochim. Biophys. Acta.* 639:197-223.
- Serrano, R. 1985. Plasma Membrane ATPase of Plants and Fungi. CRC Press, Inc., Boca Raton, FL. 33-69.
- Borst-Pauwels, G. W. F. H. 1981. Ion transport in yeast. *Biochim. Biophys. Acta.* 650:88-127.
- Peña, A. 1975. Studies on the mechanism of  $K^+$  transport in yeast. *Arch. Biochem. Biophys.* 167:397-409.
- Rodríguez-Navarro, A., and J. Ramos. 1984. Dual system for potassium transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* 159:940-945.
- Gustin, M. C., B. Martineau, Y. Saimi, M. R. Culbertson, and C. Kung. 1986. Ion channels in yeast. *Science (Wash. DC)*. 233:1195-1197.
- Ramírez, J. A., V. Vacata, W. G. Owen, and H. Lecar. 1988. ATP-sensitive  $K^+$  channels in  $H^+$ -ATPase mutant of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biophys. J.* 55:9a. (Abstr.)
- Martineau, B., M. C. Gustin, X.-L. Zhou, M. Culbertson, A. H. Delcour, J. Adler, and C. Kung. 1988. Pressure-sensitive ion channels in yeast and *Escherichia coli*. *Biophys. J.* 410a. (Abstr.)
- Gustin, M. C., X.-L. Zhou, B. Martineau, and C. Kung. 1988. A mechanosensitive ion channel in the yeast plasma membrane. *Science (Wash. DC)*. 242:762-765.
- Miller, C., and E. Racker. 1976.  $Ca^{2+}$  induced fusion of fragmented sarcoplasmic reticulum with artificial planar bilayers. *J. Membr. Biol.* 30:283-300.
- Gómez-Lagunas, F., A. Liévano, A. Peña, and A. Darszon. 1988.  $K^+$  channels from yeast plasma membranes incorporated in black lipid membranes. *Biophys. J.* 55:2a. (Abstr.)
- Gómez-Lagunas, F., A. Peña, and A. Darszon. 1989. Yeast ion channels. Selectivity and inhibition of nutrient uptake by  $K^+$  channel blockers. *Biophys. J.* 54:4a. (Abstr.)
- Calahorra, M., J. Ramírez, and A. Peña. 1987. Electrochemical potential and ion transport in vesicles of yeast plasma membrane. *Biochim. Biophys. Acta.* 899:229-238.
- Franzoso, A. J., and V. P. Cirillo. 1983. Glucose transport activity in isolated plasma membrane from *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 258:3608-3614.
- Müller, P., and D. O. Rudin. 1969. Bilamellar lipid membranes: techniques of formation, study of electrical properties, and induction of ionic gating phenomena. In *Laboratory Techniques in Membrane Biophysics*. H. Passow and R. Stämpfli, editors. Springer-Verlag, Berlin. 141-156.
- Alvarez, O., D. Benos, and R. Latorre. 1985. The study of ion channels in planar lipid bilayer membranes. *J. Electroanal. Chem.* 12:159-177.
- Bezanilla, F. 1985. A high capacity data recording device based on a digital audio processor and a video cassette recorder. *Biophys. J.* 47:437-441.
- Wada, Y., O. Yoshinori, M. Tanifuji, M. Kasai, and Y. Anraku. 1987. Vacuolar ion channel of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 262:17260-17263.
- Klaerke, D. A., S. J. D. Karlsh, and P. L. Sorgenen. 1987. Reconstitution in phospholipid vesicles of calcium activated potassium channel from outer renal medulla. *J. Membr. Biol.* 95:105-112.
- Kotyk, A., C. Horák, and A. Knotkova. 1982. Transport protein synthesis in non-growing yeast cells. *Biochim. Biophys. Acta.* 698:243-251.
- Moran, N., G. Ehrenstein, K. Iwasa, C. Baré, and C. Mishke. 1986. Ionic channels in plant protoplasts. In *Ionic Channels in Cells and Model Systems*. R. Latorre, editor. Plenum Publishing Corp., New York. 195-206.