

03081

7
2ej

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

POSGRADO EN INVESTIGACION

BIOMEDICA BASICA

I.F.C.



**EL PAPEL DE LOS ACIDOS ORGANICOS DEBILES Y
EL BICARBONATO EN LA ACUMULACION DEL K⁺ EN
LA LEVADURA.**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTORA EN
INVESTIGACION BIOMEDICA BASICA**

P R E S E N T A

M. en C. RUTH LOPEZ ALCANTARA

MEXICO, D. F.

1999

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

} 274627



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.

PASINACION

DISCONTINUA.

INDICE

RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	3
1. El transporte del K^+ en la levadura.	3
2. La cinética de los sistemas de transporte del K^+ .	4
3. Otros sistemas de transporte para el K^+ .	6
4. El potencial de membrana y el transporte de K^+ .	7
5. Los potenciales en la membrana plasmática de la levadura.	9
6. El potencial de Donnan.	9
7. Técnicas para la medida del potencial transmembranal.	10
8. El potencial de superficie de la membrana.	11
9. Los cambios del pH intracelular en <i>S cerevisiae</i> .	11
10. Activación de los sistemas de entrada de potasio por otros mecanismos.	13
11. La dinámica del CO_2 en la levadura.	14
12. El pH interno y los aniones de ácidos débiles en la acumulación de K^+ .	16
OBJETIVOS.	18
MATERIALES Y METODOS.	19
1. Microorganismo y condiciones de cultivo.	19
2. Medición de la acumulación de iones.	19
3. Determinación de bicarbonato.	19
4. Determinación del contenido de potasio.	19
5. Distribución de ácido propiónico radioactivo.	20
6. Estimación del potencial de membrana.	20
7. Determinación del pH interno.	20

8. Determinación del pH externo.	20
8. Respiración.	20
RESULTADOS.	23
1. Acumulación de CO ₂ a diferentes valores de pH.	23
2. Acumulación de potasio a diferentes valores de pH.	24
3. pHi y pHext. de células incubadas en glucosa o etanol.	25
4. Efecto del ácido propiónico en la acumulación de potasio	27
5. Efecto del ácido propiónico en la acumulación de CO ₂ .	28
6. Acumulación de ácido propiónico radioactivo .	28
7. Efecto del ácido propiónico sobre el potencial de membrana plasmática.	29
8. Efecto del ácido propiónico sobre la respiración.	30
9. Estimulación de la ATPasa plasmática por aniones bicarbonato y propionato	30
10. Efecto de inhibidores sobre la acumulación de K ⁺ y CO ₂ .	30
DISCUSION.	31
CONCLUSIONES.	36
BIBLIOGRAFIA.	37

Este trabajo fue realizado en el departamento de Genética y Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular bajo la dirección del Investigador emérito el Dr. Antonio Peña Díaz, a quien agradezco infinitamente su apoyo, confianza e interés brindados.

Nomenclatura:

TRK1, gen que codifica para el sistema de transporte de K^+ de alta afinidad

TRK2, gen que codifica para el sistema de transporte de K^+ de baja afinidad

PMAl, gen que codifica para la ATPasa de membrana plasmática.

KATI, *TOK1*, gen que codifica para un canal rectificador entrante de K^+ .

$\Delta\mu_H^+$, potencial electroquímico de protones.

DCCD, diclorohexilcarbodiimida.

DNP, 2,4-dinitrofenol.

ΔpH , gradiente de pH.

$\Delta\Psi$, potencial de membrana.

TTP^+ , tetrafenilfosfonio.

$DiSC_3(3)$, ditiocarbocianina (cianina).

pH_i , pH interno.

pH_e , pH externo.

ABSTRACT

As reported by other authors, yeast cells using glucose as carbon source, accumulate large amounts of carbon dioxide, carbonic acid, bicarbonate, and K^+ than when the carbon source was ethanol. The addition of propionic acid to the cells increased the accumulation of K^+ in ethanol grown cells, but not when in the presence at glucose.

The internal pH of the cells grown on ethanol was lower than in those grown in glucose, suggesting that the intracellular pH decrease was not the limiting factor for potassium accumulation. When the membrane potential was estimated, it was found that it was higher with glucose as substrate than with ethanol. Also, with ethanol, the addition of propionic acid increased the membrane potential, in agreement with an accumulation of dissociated monovalent acids, which are not diffusible. As a result of anion accumulation, the negative membrane potential inside increased, providing an additional driving force to accumulate larger amounts of monovalent cations.

The addition of propionic acid to cells incubated with glucose produced an efflux of carbon dioxide from the cells, indicating that the acids were exchanged across the membrane.

RESUMEN

Como lo informaron otros autores, con glucosa como fuente de carbono, las levaduras acumulan una mayor cantidad de CO_2 , ácido carbónico, carbonato y K^+ que cuando se incuban con etanol. La adición de ácido propiónico produjo aumento en la acumulación de potasio en células incubadas con etanol como sustrato, pero no en las incubadas con glucosa.

Por otro lado, el pH interno de las células incubadas con etanol fue más bajo que en las incubadas con glucosa, sugiriendo que la disminución del pH interno no es un factor limitante para la acumulación de potasio.

Cuando las células se incubaron con glucosa, la diferencia de potencial de la membrana fue mayor que cuando se incubaron en etanol. La adición de ácido propiónico aumentó dicho potencial en las células con etanol como sustrato, indicando que la acumulación de aniones de ácidos monoproticos, que no difunden hacia fuera de la membrana, aumenta el potencial negativo en el interior de la célula, el cual favorece la acumulación de cationes monovalentes.

Además, se encontró que la adición de ácido propiónico al medio de incubación con glucosa como sustrato, produjo una salida de CO_2 de la célula, al parecer intercambiándose por propionato y por eso en este caso no se observó entrada de K^+ adicional.

Para explicar estos resultados se propone que la acumulación de bicarbonato, derivado de la producción de CO_2 y posterior hidratación, genera un potencial de Donnan, negativo en el interior. Es decir, la actividad de la ATPasa de membrana plasmática, que bombea protones al exterior, permite retener la forma ionizada del ácido carbónico (el bicarbonato), el cual no puede difundir al exterior y permite la acumulación de cantidades adicionales de K^+ . Este mecanismo además explica, por qué esta levadura, que produce grandes cantidades de CO_2 , el cual se hidrata a H_2CO_3 ; puede alcanzar valores de pH citoplásmico cercanos a 7. Por otro lado, permite mantener un gradiente de protones muy grande a través de la membrana plasmática y aprovecharlo de manera indirecta en la acumulación de K^+ .

INTRODUCCION

El transporte del K^+ en la levadura.

Todas las células requieren potasio y lo acumulan en el interior para diversos fines. Probablemente fue la levadura el organismo en el cual se realizaron los primeros estudios formales sobre el transporte de iones, en especial del potasio. A través del tiempo, se definieron para este fenómeno las características generales (Conway y O'Malley, 1946) y se hicieron propuestas sobre los mecanismos básicos (Conway y cols, 1958; Peña y cols, 1969, 1972) y su cinética (Conway y Duggan, 1958; Rothstein y Bruce, 1958; Borst-Pauwels, 1981; Rodríguez-Navarro y cols., 1984; Ramos y cols., 1985).

Conway y O'Malley (1946), realizaron estudios orientados a elucidar el mecanismo de transporte de potasio en la levadura; este grupo observó una relación prácticamente estequiométrica de 1:1 entre la entrada de potasio y la acidificación del medio durante la fermentación. Después, en los años cincuenta (Conway y cols., 1950), se postuló que la entrada de potasio y otros iones a la célula se llevaba a cabo preferentemente por un sistema de transporte o acarreador fisiológico de K^+ , y se propuso una "bomba" que podía funcionar produciendo el intercambio de K^+ por H^+ , en un mecanismo eléctricamente neutro para la membrana plasmática (Conway y Brady, 1950).

Mediante experimentos de transporte y consideraciones cinéticas; la célula en la que por primera vez se demostró la presencia de un acarreador fue la levadura (Conway y Duggan, 1958; Rothstein y Bruce, 1958). Para dicho sistema de transporte, Conway y cols. (1950), plantearon como hipótesis, la existencia de un acoplamiento del movimiento de los protones y del K^+ , que se efectúa a expensas de la energía libre de las reacciones de óxido-reducción del metabolismo celular. Peña y cols. (1967) encaminaron su investigación, a localizar las reacciones de la secuencia glucolítica responsables de la activación de la ruta metabólica, en presencia de iones potasio; al analizar algunos intermediarios importantes de la glucólisis, no confirmaron que el poder reductor de las células fuera la fuerza motriz para el transporte de potasio. Sin embargo, luego se definió que el sistema está constituido por una bomba de protones (Peña y cols, 1972; Peña, 1975).

Rothstein y Demis (1953), estudiaron la estimulación de la fermentación, producida por la presencia de potasio en el medio extracelular; sus datos fueron verificados por Peña y cols. (1967), pero estos autores encontraron que además del proceso de fermentación, el K^+ también estimulaba la respiración.

Peña y cols. (1969), confirmaron que la adición de potasio a la levadura, producía variaciones notables en los niveles de los nucleótidos de adenina; así como la estimulación en respiración y glucólisis: proponiendo que el fenómeno se debía a la disminución en la concentración de ATP, y fundamentalmente al aumento en la concentración del ADP. Esto llevó a pensar, que el gasto de ATP podía ser una consecuencia de los requerimientos del sistema de transporte de potasio, o

que la presencia del ion dentro de la célula, inducía los cambios necesarios para estimular la actividad de una ATPasa (Peña y cols. 1969). En 1972, informaron que el pH alcalino del medio sin K^+ , también ejercía la estimulación de ambos procesos celulares (fermentación y respiración), acompañado de la salida rápida de H^+ ; y cuando el pH del medio era ácido, esta salida de H^+ se aceleraba al agregar K^+ .

Slayman y cols. (1973), estudiaron en otro sistema (*Neurospora crassa*), el efecto del pH extracelular sobre el transporte de cationes. Sugirieron que la entrada de K^+ y la salida de H^+ , se podía explicar en términos de la existencia de una bomba de protones, que generaba una diferencia de potencial electroquímico al nivel de la membrana plasmática.

Estudios posteriores consistieron en la reconstitución de la ATPasa (Malpartida y Serrano, 1981) y la identificación de los componentes implicados en el transporte de potasio (Calahorra y cols., 1987). Finalmente se clonaron y secuenciaron los genes de la ATPasa (Serrano, 1986) y los de los transportadores de K^+ (Gaber y cols., 1988; Ko y cols., 1990) llevando poco a poco a la descripción de un complicado sistema de transportadores, impulsados por el potencial electroquímico generado por una bomba de protones (Peña y cols., 1975; ver más adelante).

El principio de la teoría quimiosmótica de Mitchell (1968); así como las investigaciones en hongos y levaduras, permitieron plantear que:

- El ATP se utiliza como fuerza impulsora para la salida activa de protones.
- El gradiente de protones genera un potencial transmembranal, negativo en el interior de la célula;
- La entrada del potasio utiliza dicha diferencia de potencial;
- El bombeo de los protones y la entrada del K^+ , ocurren por dos acarreadores diferentes;
- La salida de aniones balancea la de H^+ cuando el pH es ácido, de acuerdo con los experimentos de Conway y Brady (Conway y Brady 1950; Peña y cols., 1972).

La cinética de los sistemas de transporte del K^+ .

Los estudios cinéticos que se han realizado sobre el transporte de K^+ , indican que se trata de un sistema complejo, porque varios factores importantes como el potencial de membrana, pH, etc., lo influyen directamente. Conway y Duggan (1958) y Rothstein y Bruce (1958), demostraron que el transporte de K^+ sigue una cinética del tipo Michaelis-Menten a pH 6 y 7, lo cual podía indicar que estaba involucrado un sistema de transporte unisitio. Posteriormente, Armstrong y Rothstein (1964; 1967), sugirieron la participación de diferentes factores, sobre el sistema acarreador al observar desviaciones de la cinética de Michaelis-Menten en el transporte de K^+ a pH ácido, por la influencia de otros iones. Por ejemplo, señalaron la existencia de un efecto de inhibición competitiva cuando el pH externo era 6.0; que pudo ser interpretado como una interacción de H^+ directamente con un sitio del acarreador involucrado en el transporte de K^+ .

En estudios similares, Borst-Pauwels y cols. (1973), encontraron que había estimulación del transporte de potasio por influencia de concentraciones muy pequeñas de otros iones en el medio

de incubación. Slayman y cols. (1970) y Borst-Pauwels y cols (1971), consideraron que el transporte de K^+ , se efectuaba a través de un acarreador multisitio, modelo que explicaba las diferencias observadas a la cinética de Michaelis a pH ácido y alcalino; esto es, consideraron que en el acarreador, los protones no sólo se unían a un sitio para sustrato, si no también a un segundo sitio llamado modificador (sin función de transporte), causando una inhibición parcial. Así mismo, los H^+ podían reemplazarse por el catión sustrato (potasio) o por algún otro catión monovalente, que se encontrara a concentración mayor.

Posteriormente, Borst-Pauwels (1973) propuso la existencia de un tercer sitio (involucrado en el transporte del catión monovalente) al que denominó sitio de activación.

Dado que el Rb^+ y el Na^+ se transportan por el mismo acarreador de potasio, Derks y Borst Pauwels (1980), describieron que a bajas concentraciones de Rb^+ y pH ácido, existía una relación sigmoideal entre la velocidad de entrada y la concentración. A pH alto las desviaciones de la cinética de Michaelis-Menten no eran tan pronunciadas. Estas diferencias las atribuyeron a una inhibición parcial no competitiva de los H^+ , donde la inhibición pudo superarse por aumento en la concentración de Rb^+ . Al sitio involucrado en esta inhibición parcial, le llamaron sitio de activación, debido a que el transporte de $^{86}Rb^+$ aumentó al incrementarse la concentración de Rb no radiactivo en el medio.

Las divergencias cinéticas que se encuentran en la literatura sobre el comportamiento del transportador por la presencia de algunos cationes como Cs^+ , Rb^+ y K^+ , pueden deberse a que existen diferencias en sus propiedades, de una levadura a otra (Brunner, y cols, 1982).

Rodríguez-Navarro y Ramos (1984), observaron que los parámetros cinéticos del transporte de potasio, variaban significativamente con las condiciones de crecimiento. Cuando se trabaja con levaduras en fase de crecimiento, se manifiestan dos formas (o sistemas) de transporte de K^+ : un sistema con dos sitios de interacción o dos sistemas de transporte diferentes (Rodríguez Navarro y Ramos 1985, 1986). Uno de ellos se presenta con baja afinidad (K_m 2 mM), a concentraciones de K^+ relativamente altas, y otro de alta afinidad (K_m 20 μ M), cuando la concentración de K^+ en el medio es baja. Estos dos sistemas de transporte no sólo difieren en su cinética, sino también en su dependencia del pH, sensibilidad a desacoplantes, respuesta a cambios en el ATP y en la dependencia a la temperatura. Por otro lado, los datos sugieren que el acarreador de baja afinidad se convierte en, o se reemplaza por el de alta afinidad, pero no coexisten durante el crecimiento. Según los resultados cinéticos con mutantes de levadura (Ramos y Rodríguez Navarro, 1986), estos dos posibles sistemas de transporte de potasio, se regulan por transinhibición, debida al contenido de K^+ interno y por conversión de un estado de baja a uno de alta afinidad, que se da en condiciones de ayuno.

Gaber y cols. (1988), continuando en la misma dirección, mediante experimentos de biología molecular, aclararon sin duda que el sistema de transporte de potasio es independiente de la ATPasa de protones y que se trata de dos sistemas diferentes. La identificación del gen *TRK1*, requerido para el transporte de alta afinidad para potasio (Gaber y cols., 1988), y el gen *PMA1* de la ATPasa de la membrana plasmática (Serrano, 1986); demostraron que son codificados por *loci* no relacionados. La mutación del *TRK1* en la levadura confiere un defecto significativo en el

transporte de potasio de alta afinidad, pero no en el bombeo de protones ni en el transporte de potasio de baja afinidad. Posteriormente, se clonaron los genes *TRK1* (Gaber y cols., 1988) y el *TRK2* (Ko y cols., 1990).

Brunner y cols. (1982), en una mutante de *Kluyveromyces lactis*, también produjeron un defecto en el transporte de potasio, sin afectar el bombeo de protones. Se ha logrado clonar y secuenciar este gen responsable, del cual en *K. lactis*, sólo existe una copia (Peña y cols., comunicación personal).

Un enfoque previo, para demostrar que el transporte de potasio implica un acarreador que usa el gradiente electroquímico generado por una ATPasa de protones, consistió en el uso de inhibidores del transporte que no afectan a la ATPasa. Pressman (1963) y Chapell (1963), informaron que varios derivados de guanidinas actúan como inhibidores del metabolismo mitocondrial. También se había descrito cierta similitud entre los cationes monovalentes y algunas moléculas orgánicas de naturaleza catiónica, como la guanidina, con relación al efecto que tienen sobre la permeabilidad del canal de Na^+ en células nerviosas (Hille, 1971).

Para tratar de establecer la relación entre los flujos de K^+ y H^+ a través de la membrana plasmática de levaduras, el grupo de Peña, (1973), realizó estudios con diversos inhibidores, entre los cuales se utilizaron las alquilguanidina y algunos colorantes, esperando que estos compuestos pudieran inhibir el transporte de potasio en la levadura, para observar el efecto de los mismos sobre la salida de H^+ (Peña y cols., 1979). Peña (1973) encontró que las alquilguanidinas, inhibían el transporte de K^+ competitivamente, sin alterar la salida de protones; efecto que a su vez encontró de manera más clara con bromuro de etidio (Peña y Ramírez, 1975), permitiendo separar la actividad de bombeo de protones de la del transporte de potasio.

Otros sistemas de transporte para el K^+ .

En *Neurospora crassa*, Blatt y cols. (1987), describieron que el potasio se cotransporta con protones, en una relación 1:1 (simporte); este mecanismo permite aprovechar el gradiente electroquímico creado por la bomba de protones, para sostener el gradiente de potasio a través de la membrana del hongo. En *Saccharomyces cerevisiae* se ha intentado encontrar dicho cotransporte sin ningún éxito, a pesar de que Boxman (1984), sugirió la existencia de un simportador en esta levadura.

El grupo de Kung (Gustin y cols., 1986), realizó estudios electrofisiológicos en la membrana plasmática de levaduras, y encontró canales iónicos dependientes de voltaje en un número aproximado de 7 a 10 por célula. Las características más sobresalientes de estos canales son: la activación por voltajes positivos (corriente de despolarización) y no por voltajes negativos, su alta selectividad al ion potasio comparada con el sodio, conductancia de 20 picosiemens, etc. Gustin y cols. (1988) plantearon que la función de estos canales probablemente sea el regular la homeostasis del potencial de membrana celular. Van de Mortel y cols. (1988), sugirieron que la apertura de canales de K^+ de la membrana plasmática, es la responsable del eflujo de potasio e hiperpolarización transitorios de la membrana que observaron. El mismo grupo de Kung (Gustin

y cols., 1988), informó sobre la existencia de un canal iónico diferente al anterior, el cual se regula por energía mecánica (tensión de la membrana). La probabilidad de apertura del canal mecanosensible, podría ser función de la presión aplicada y del tamaño celular. Para canales regulados por presión osmótica, la probabilidad de apertura es independiente del tamaño celular. Estos canales tienen una selectividad muy pobre para cationes alcalinos, indicando probablemente una función de osmorregulación, aprovechando el gradiente de K^+ como fuente de energía. En 1995 Bertl, realizó la caracterización de un canal rectificador entrante de potasio, mediante análisis de patch-clamp, codificado por el gen KAT1.

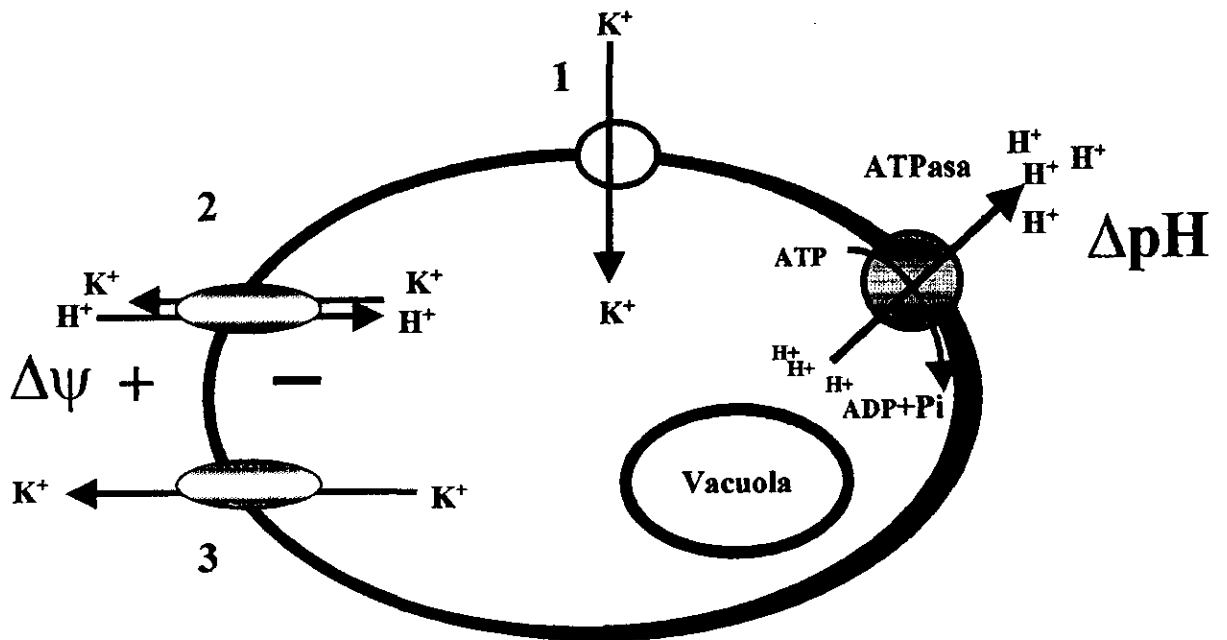
La membrana plasmática de las levaduras posee diferentes clases de canales para K^+ , que varían en sus propiedades de apertura. Van de Mortel y cols. (1990), caracterizaron un canal de potasio que se abre transitoriamente a valores de pH por arriba de 5.5, al inicio del metabolismo celular. Este canal puede bloquearse por su posible interacción con algún sitio externo del canal, con concentraciones micromolares de cationes polivalentes externos; pero difieren de los canales descritos por Gustin, en su insensibilidad a TEA y 3,4-diaminopiridina entre otras cosas.

Sin embargo para Peña y cols. (1991), era poco probable que los resultados presentados por van de Mortel en 1990, fuesen indicativos de la presencia de un canal. Datos adicionales indicaron que la salida de potasio podía estimularse por gadolinio (Gd^{3+}) o terbio (Tb^{3+}), ya descritos como inhibidores de canales iónicos (Gustin, 1988). Peña y su grupo demostraron que, bajo sus condiciones experimentales, los resultados correlacionan más con un sistema intercambiador K^+-H^+ . Una explicación posible a la inhibición del eflujo de potasio por cationes bivalentes, era el efecto conocido de éstos sobre el transporte de potasio a través de los cambios que producen sobre el potencial de membrana. De acuerdo con esta idea, Ramírez y cols. (1996) y Camarasa y cols. (1996), utilizando vesículas de membrana plasmática de levaduras, demostraron un intercambio H^+/K^+ electroneutro, que puede inducir la entrada de ^{86}Rb , aparentemente contra una diferencia de potencial electroquímico, que muestra baja afinidad por el catión y que se inhibe por amilorida.

La Fig. 1 representa algunos sistemas de transporte de potasio en la levadura: Un uniportador, utiliza como energía la diferencia de potencial ($\Delta\Psi$) que se establece a través de la membrana plasmática; un antiportador H^+-K^+ , que utiliza como fuerza motriz el gradiente de protones (ΔpH) existente entre citosol y medio externo, y canales iónicos, que pueden utilizar el $\Delta\Psi$ como fuente de energía, pueden ser regulados por energía mecánica o responder a cambios de presión osmótica.

El potencial de membrana y el transporte de K^+ :

Durante muchos años, se buscó un intermediario químico que acoplara la oxidación metabólica con la síntesis de ATP. Peter Mitchell (1961), inspirado en los trabajos de Conway (Conway y cols., 1950), postuló la hipótesis quimiosmótica, con el propósito de explicar los mecanismos de conservación de energía y el transporte de iones en los sistemas vivos. Así, este autor sugirió que el único "intermediario" en la fosforilación oxidativa, era el acoplamiento a la cadena transportadora de electrones (de mitocondrias o bacterias), mediante el gradiente de



**Fig. 1 Sistemas de transporte de potasio en la levadura. 1: uniportador
2: antiportador H^+ - K^+ 3: canales iónicos**

protones creado a través de la membrana y que genera un potencial electroquímico $\Delta\mu_{H^+}$. Este potencial, es necesario para mover iones, mediante sistemas de transporte específicos, en contra de un gradiente de concentración.

De acuerdo con esta teoría, los sistemas de transporte pueden ser:

- Transportadores primarios o bombas (ATPasas, que obtienen la energía del ATP de la célula).
- Los sistemas de transporte de electrones (de la cadena respiratoria).
- La proteína bacteriorrodopsina (que es capaz de usar la luz para bombear protones y sintetizar ATP).
- Transportadores secundarios (portadores, que obtienen la energía de los potenciales formados por la bomba).

Posteriormente aparecieron resultados que sostenían el punto de vista de una entrada electroforética de protones en diferentes microorganismos, acompañada de la entrada de algunos sustratos, como azúcares y aminoácidos. Eddy y cols. (1970), evidenciaron en células desenergizadas de *S. cerevisiae*, una relación estequiométrica entre la entrada de protones y el transporte de algunos aminoácidos y de maltosa.

Riemersma y Alsbach. (1974), trabajando con *S. cerevisiae* durante su metabolismo anaerobio, presentaron pruebas de que el transporte de K^+ podía estar acoplado de una forma indirecta a la salida activa de H^+ . Ellos compararon las características del transporte de H^+ y K^+ y detectaron cambios en la distribución de carga en la superficie externa de la célula. Esto lo hicieron mediante el uso de ciertos iones lipofílicos, que no funcionan como moléculas permeantes a la membrana, sino como pruebas de interacción con ésta.

La forma de aclarar el problema no fue sencilla. A partir de experimentos con desacoplantes, para inhibición del transporte de K^+ , varios autores habían elaborado hipótesis acerca del mecanismo involucrado para dicho efecto. Riemersma (1968) propuso que en la transducción de energía de la célula hacia los sistemas de transporte en la membrana, estaba involucrada la hidrólisis de un intermediario hipotético de alta energía. Borst-Pauwels (1971), señaló a partir de datos cinéticos, que la presencia de bajas concentraciones de DNP inhibía el transporte de Rb^+ por un efecto directo del desacoplante sobre el acarreador. Misra y Höfer (1975) informaron que la levadura *Rhodotorula gracilis*, aerobia obligada, bombea H^+ por un proceso que requiere K^+ y es sensible a desacoplantes y a DCCD. Como dato adicional se sabía, por los trabajos en electrofisiología de Slayman (1965) con *N. crassa*, que el potencial de membrana era extremadamente sensible a DNP (2,4-dinitrofenol). Los resultados mostraron despolarización de la membrana plasmática en cuestión de segundos; indicando que una bomba de iones electrogénica estaba directamente acoplada al metabolismo y funcionaba para separar cargas a través de la membrana.

Peña (1975) y De la Peña (1981), mostraron que el efecto de los desacoplantes en las levaduras, dependía de la dirección de los gradientes de H^+ y K^+ o del potencial electroquímico de la célula. De acuerdo con los reportes sobre la capacidad de la membrana para conducir protones; Peña planteó la existencia de una bomba de protones (ATPasa), responsable de crear el

potencial electroquímico, que involucra el transporte de potasio de una forma acoplada pero independiente, acorde a lo descrito por la hipótesis quimiosmótica.

El transporte de potasio, utiliza el potencial de membrana formado por el bombeo de protones ($\Delta\Psi$ de -45 a -80 mV en *S. cerevisiae* (de la Peña, 1982)). Höfer y cols. (1985), trabajando con *R. gracilis*, interpretaron sus resultados, para el acoplamiento del flujo de potasio y protones, como un sistema electroneutro dependiente de energía (Hauer y cols., 1981).

La identificación de la ATPasa de la membrana plasmática como responsable del bombeo de protones capaz de generar un gradiente electroquímico, viene de estudios con mutantes de levadura deficientes en respiración y de experimentos con inhibidores de la ATPasa de membrana plasmática. Con estas mutantes de *S. cerevisiae*, Serrano (1980) observó que el dietilstilbestrol y la dicitclohexilcarbodiimida inhibían la actividad de la ATPasa y el bombeo de protones de una manera específica, sin afectar los niveles de ATP celular ni la permeabilidad a los protones. Estos resultados, Serrano (1980) puntualizó, sugerían que la actividad de la ATPasa de membrana plasmática correspondía a la bomba de protones de la levadura.

Posteriormente se obtuvo una evidencia directa de la actividad de bombeo de la ATPasa de membrana plasmática y electrogenicidad del proceso, al purificar la enzima y reconstituirla en liposomas (Villalobo, A. y cols., 1981; Malpartida y Serrano, 1981). En este sistema, el ATP se hidrolizaba del lado externo de la membrana y la entrada de H^+ generó un potencial de membrana, positivo en el interior. La naturaleza electrogénica del bombeo de protones, se demostró por el movimiento de H^+ que sólo tiene lugar en presencia de un catión y un ionóforo (K^+ -valinomicina), para compensar la carga. Además observaron que el gradiente electroquímico de protones generado a través de la membrana del liposoma, controlaba la velocidad de hidrólisis de ATP, y la estequiometría del bombeo (H^+/ATP) de la ATPasa era modulada por el metabolismo en *N. crassa* (Warncke y cols., 1980).

Además, la actividad de la ATPasa está regulada por otros factores. Eraso y Gancedo (1987) y Carmelo (1997), describieron que la acidificación del medio extracelular, así como la glucosa, causa activación de la ATPasa. Riemersma (1974), informó que los cambios en el pH interno, son capaces de regular la actividad de la enzima. Benito y cols., (1992), describieron que la ATPasa se activa, "in vivo", en levaduras en ayuno de nitrógeno.

Los potenciales en la membrana plasmática de las levaduras:

Una capacidad particular de las células consiste en generar diferencias de concentración a través de su membrana. El movimiento de agua y moléculas (neutras o con carga), de un lado a otro de la membrana genera gradientes químicos y de carga eléctrica, que conducen a la formación de potenciales electroquímicos. La forma en que se puede generar un potencial de membrana puede ser: mediante el funcionamiento de una bomba electrogénica de iones, como se mencionó en el apartado anterior, o por la presencia de moléculas en las que el catión y el anión tienen distinto coeficiente de permeabilidad. Esto provoca que uno de los iones se mueva más rápidamente que el otro, por la facilidad que tiene para atravesar la membrana, creando un

potencial de difusión (Ohki, 1981). Esta distribución desigual de las cargas eléctricas a ambos lados de la membrana es lo que se conoce como diferencia de potencial, o simplemente potencial de membrana.

Hay varios mecanismos para la formación de potenciales electroquímicos a través de las membranas biológicas, que se pueden cuantificar por la teoría de Nerst o la de Donnan, que permiten calcular la magnitud del potencial o describir la relación de concentración de los iones a través de dos fases, respectivamente.

El potencial de difusión se produce cuando la membrana es permeable a un ion y éste se ha acumulado en uno de sus lados. Esta situación influye particularmente, en las estructuras celulares transductoras de energía, debido a la presencia de transportadores en la membrana que específicamente producen la salida de un ion. Como resultado, cuando se suspenden estas estructuras en un medio de baja fuerza iónica, los cationes más móviles salen del orgánulo o de la célula, hasta que el potencial inducido compensa el gradiente de concentración de cationes.

Potencial de Donnan:

Donnan y Gibbs mostraron que en presencia de un ion que no difunde, los iones que sí difunden se distribuyen de manera que, en el equilibrio, sus relaciones de concentración son iguales de un lado y otro de la membrana.

$$[K^+_{ext}] / [K^+_{int}] = [Cl^-_{int}] / [Cl^-_{ext}] = r$$

el término "r" se denomina *relación Donnan*

Entonces, la ecuación para el potencial de membrana en el modelo Donnan es:

$$\psi = (RT/F) * \ln r$$

Este ψ , es causado por la distribución desigual de los cationes, y que para iones monovalentes debe ser idéntico al potencial creado por la distribución desigual de aniones. Es decir, la presencia de un ion impermeante, como el HCO_3^- de un lado de la membrana, demanda un número desigual de iones que difunden en las dos fases separadas por la membrana, todo para que la neutralidad eléctrica pueda mantenerse.

Técnicas para la medida del potencial transmembranal:

Son muchas las técnicas que se han desarrollado con el fin de medir el potencial transmembranal de las células. Por ejemplo, por medio de microelectrodos en *N. crassa*, se encontró un potencial de -260 mV, en células maduras e incubadas en pH alto (Slayman, C.L., 1965); en *Endomyces magnussi*, que tiene aproximadamente 100 veces el volumen de *S. cerevisiae*, se informó un potencial estable de -35 mV a pH 7.5 (Vacata y cols., 1981; Bakker y

cols., 1986).

Sin embargo, los organelos, vesículas y células de levadura, son estructuras muy pequeñas para ser estudiadas por microelectrodos. En *S. cerevisiae*, el potencial de membrana medido por éste medio no es estable y decae con una vida media de 0.2 - 3 segundos. Además, no se observan diferencias significativas en la medida del potencial de membrana, cuando el sistema se encuentra en presencia de dinitrofenol 1mM o en diferentes estados metabólicos (Borst-Pauwels, 1981).

En los 70's, para medir cambios en la diferencia de potencial eléctrico de estructuras pequeñas, se usaron cationes como el tetrafenilfosfonio (TTP^+) y el trimetilfenilfosfonio. Por su naturaleza lipofílica, éstas moléculas son capaces de atravesar la membrana celular, y su distribución depende del potencial transmembranal (Hauer and Höfer, 1978). Sin embargo, parece que la distribución del TTP^+ , en el interior de la levadura en particular, no mantiene una relación cuantitativa con el voltaje de la membrana; ni en la magnitud, ni en la sensibilidad a los cambios del pH. Estas son limitaciones que muestran que dichas moléculas no se pueden usar en métodos cuantitativos, para medir el potencial eléctrico de la membrana celular (Bakker y cols., 1986; Ballarin-Denti y cols., 1994).

También se han utilizado colorantes fluorescentes para estimar, más que medir, los cambios del potencial de membrana (al mostrar cambios en la fluorescencia y transmisión de la luz). Waggoners (1979), menciona tres clases de colorantes sensibles a potencial: merocianinas, cianinas y oxonoles. Las moléculas una vez en el interior de la célula, se distribuyen y acumulan en función del potencial eléctrico existente.

En 1984 Peña y cols., realizaron experimentos con cianina DiSC₃(3), en un intento de utilizarla como un indicador de los cambios en el potencial de membrana de la levadura; concluyeron que dicho compuesto es un buen indicador cualitativo del potencial de membrana mitocondrial y plasmática (cuando se anula la capacidad de la mitocondria para concentrar el colorante por medio de un desacoplante). Además, es importante mencionar que sobre una base cualitativa, la cianina se puede usar para seguir cambios rápidos en el potencial de membrana.

El potencial de superficie de la membrana:

Por otro lado, la influencia de cargas negativas fijas, en las membranas transductoras de energía, induce la formación del potencial superficial. A causa de este potencial, la concentración de iones en la vecindad de la membrana, es mayor que en el seno de la fase acuosa. Junge (1977), Ohki (1971, 1972) y MacDonald, 1972, en membranas de fosfolípidos, fueron los primeros en mostrar la contribución del potencial de superficie al potencial transmembranal.

Los fosfolípidos aniónicos de la membrana de levaduras (fosfatidilinositol y fosfatidilserina), contribuyen en gran medida en la magnitud de las cargas fijas (densidad de carga superficial negativa) (Cerbón y Calderón, 1990). La concentración de los fosfolípidos en la membrana

celular (con carga neta negativa), es un factor que controla la densidad de carga superficial. El potencial de superficie a su vez, se comporta como factor que puede modular la síntesis de estos fosfolípidos aniónicos, regulando su concentración y transposición (interna-externa) (Cerbón y Calderón, 1990, 1994). Aparentemente, la presencia de las cargas negativas (de los fosfolípidos) en la vecindad de los sitios de enlace de sistemas de transporte iónico, ejercen cierto efecto sobre la cinética del transporte (Borst-Pauwels, 1981) al concentrar cationes y excluir aniones en la membrana o pared celular.

Los cambios del pH intracelular en *S. cerevisiae*:

Durante la actividad metabólica, se generan ácidos débiles que acidifican el interior celular; por esta razón, la medición del pH interno ha sido uno de los tópicos analíticos más importantes en el área. El pH es un factor que determina mucho del comportamiento general de las células, por ejemplo: características importantes de la estructura, de la actividad de las enzimas y otras moléculas biológicas y de los procesos celulares (incluyendo los de transporte).

Los métodos más antiguos para estimar el pH_i se realizaron directamente lisando u homogeneizando las células (por ebullición o por congelamiento-descongelamiento). Sin embargo esta homogeneización celular, rompe los organelos intracelulares, lo cual hace imposible la determinación real del pH citosólico (Conway y Downey, 1950; Roos y Boron, 1981).

Conway y Downey, (1950), utilizaron la capacidad de distribución de ácidos orgánicos débiles, como el propiónico y carbónico, para medir el pH_i en células de levadura. La técnica se fundamenta en que sólo la forma protonada cruza la membrana; entonces el pH_i puede calcularse al conocer su distribución en el estado estacionario, toda vez que el pH_e y el valor del pK_a interno y externo se conozcan (estas constantes se relacionan en la ecuación de Henderson-Hasselbach).

Deamer y cols. (1972), utilizaron moléculas fluorescentes ionizables para determinar el gradiente de pH a través de la membrana de liposomas; estas moléculas son permeantes en la membrana y se distribuyen entre el citoplasma, los organelos y el medio externo, dependiendo del pH. Slavík en 1982, introdujo esta técnica a levaduras, utilizando un éster fluorescente, que al entrar en contacto con esterases se transforma, produciendo una molécula impermeante en la membrana que se retiene en el interior de la célula. De este modo, estimó el gradiente de pH a través de la membrana de la levadura (Slavík y cols., 1984). Sin embargo Slayman y cols. (1994), mencionan que las esterases se encuentran acumuladas preferentemente en las vacuolas u otros compartimentos, donde llevan a cabo su acción, lo que es una desventaja para el uso de este colorante.

Kano y Fendler (1978) utilizaron la piranina como un indicador fluorescente del pH interno en liposomas. Pero la piranina no se incorpora a células completas, por su naturaleza hidrofílica. Para superar esta limitación, Peña y cols. (1995) introdujeron la molécula a células de levadura por electroporación. Teniendo la ventaja de que la piranina se aloja únicamente en el citosol; y

los cambios de fluorescencia registrados, al protonarse o desprotonarse la molécula, corresponden con cambios de pH en la levadura, por efecto de diferencias en las condiciones de incubación. Los datos de pH_i obtenidos, son un poco más altos que los valores reportados por otros métodos (Conway, 1950, Peña, 1972, Slavík, 1982); ésto quizá se deba a que sean más representativos de citosol, ya que no se da información de otros compartimentos celulares más ácidos, como la vacuola.

Otro método descrito en la literatura, aplicado a células de levadura intactas, es la determinación del pH interno por el espectro de resonancia magnética nuclear del ^{31}P , cuya base es el cambio químico que sufre el ortofosfato intracelular en función del pH_i (Salhany, y cols., 1975) (den Hollander y cols., 1981) (Gillies, y cols., 1981). Sin embargo, también tiene algunas limitaciones, como por ejemplo el requerir equipo sofisticado y personal técnico especializado, así como su lentitud.

Por un método u otro, se ha tratado de determinar la respuesta del pH_i bajo diferentes condiciones de incubación. Peña y cols. (1972, 1995), informaron que el pH externo influye directamente en el pH intracelular, a diferencia de lo que informó Den Hollander (1981). Posteriormente, Slavík (1984) y Cimprich (1995) confirmaron también, la dependencia del pH intracelular con el pH del medio, al medir por pruebas fluorescentes el gradiente de pH que se forma en el citoplasma, bajo diferentes condiciones de acidez.

Por otro lado, el pH celular también depende del estado metabólico de la célula y de las diferentes condiciones de cultivo (Imai y cols., 1995). En 1989 Ramos y cols., mostraron que la adición de glucosa o fructosa, inducía acidificación intracelular en *S. cerevisiae*, sugiriendo que los H^+ provenían de la etapa de fosforilación de la ruta glicolítica, argumentando que el pKa de la glucosa-6P es de 1.4 mientras el pKa de los grupos dissociables del ATP es cercano a 7.0. Además este fenómeno no se presentó en mutantes deficientes de todas las azúcar-cinasas, ni tampoco correlacionaron con el aumento del cAMP (Eraso y cols. 1987).

A pesar de la variación en el pH interno, como resultado de diferentes factores, existe una tendencia de la célula a mantener la concentración interna de H^+ , dentro del intervalo de operación óptima de las enzimas citoplásmicas (Roos and Boron, 1981). Es claro que la constancia del pH intracelular, representa un estado estacionario y no de equilibrio real; por esta razón algunos autores han tratado de atribuirle un papel predominante al bombeo de protones en el control del pH interno. Sanders (1981), en *N. crassa* observó que cuando una carga ácida causaba disminución en el pH_i , aumentó el bombeo de H^+ al exterior, acompañado de una hiperpolarización transitoria al inicio de la acidificación citoplásmica. Sin embargo, la función de la ATPasa como controladora del pH_i no es muy clara. La participación de la ATPasa para generar una gran diferencia de potencial electroquímico ($\Delta\mu_{\text{H}^+}$) es importante, pero no necesariamente la regulación del pH_i ; estaría a cargo de ella misma; ya que la respuesta de la membrana a la disminución del pH es el aumento progresivo de su conductancia. Posteriormente este mismo grupo (Sanders y Slayman, 1982), reconoce que la influencia de la ATPasa sobre el pH citoplásmico es limitada. Hay otros mecanismos, como el propio metabolismo, el cual puede liberar o consumir una buena cantidad de protones y/o moléculas, con capacidad amortiguadora, que participan para mantener el pH_i dentro de márgenes fisiológicos compatibles con las

funciones celulares, aún cuando la bomba de protones esté inhibida.

En 1986 Blatt propuso que la respuesta primaria a estrés por ácido, es el aumento de la actividad de la ATPasa de membrana plasmática. Por otro lado, el transporte de K^+ constituye una válvula esencial, para regular la salida de H^+ por medio de un simportador, descrito en *Neurospora crassa*. En las levaduras no se ha descrito este simportador.

La figura 2 muestra algunos modelos que se han propuesto para el bombeo de protones y el transporte de potasio. El esquema 1 presenta al acarreador fisiológico, donde el movimiento de H^+ y K^+ , se acopla a expensas de la energía libre de reacciones de oxido-reducción del metabolismo; el esquema 2 es un acarreador electroneutro; el movimiento de K^+ está estrechamente acoplado al transporte de H^+ (no hay transferencia neta de carga a través de la membrana); el esquema 3 propone que en la transducción de energía, para el transporte de K^+ y bombeo de H^+ , está involucrada la hidrólisis de un intermediario hipotético de alta energía; el esquema 4 representa el transporte de K^+ que se acopla al bombeo de H^+ (electrogénico), por medios independientes (uniportador y ATPasa respectivamente).

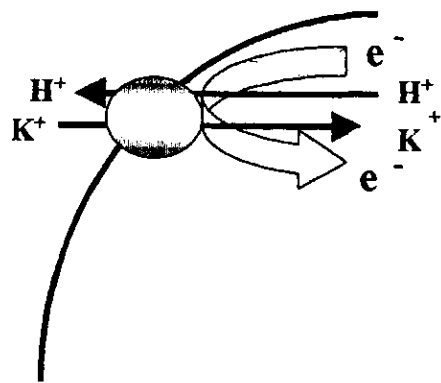
Diferentes mecanismos de activación de los sistemas de entrada de potasio.

En las levaduras, los transportadores de iones en general, se impulsan por la diferencia de potencial de membrana y el ΔpH generados por la ATPasa. Sin embargo, existen ciertas características cinéticas particulares del transporte de potasio, que también han sido objeto de estudio.

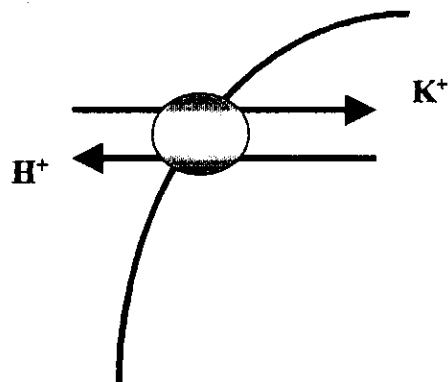
En cultivos de *S. cerevisiae*, Ramos (1986) obtuvo células con diferente contenido de K^+ , al tratarlas con azida de sodio. Encontró que la célula retenía una concentración interna de potasio mínima, a partir de la cual, no permitía mayor salida del mismo. En estas células con bajo contenido de potasio, el pH_i fue más ácido, y el transporte de Rb^+ (catión monovalente, que utiliza el mismo transportador de potasio) fue mayor, comparado con las células sin tratamiento. Ramos (1990) planteó que el mecanismo que explica este fenómeno, era el efecto de la disminución de pH_i (interno) o la activación directa de la ATPasa de membrana plasmática.

Ramos (1992), trabajando con mutantes de la ATPasa y del transporte de glucosa (de alta afinidad), analizó cinéticamente la entrada de K^+ . Sus experimentos mostraron que la presencia de glucosa u otros azúcares fermentables indujeron aumento en la V_{max} sin afectar la K_m ; además, bajas concentraciones de glucosa en el medio activaron muy poco el transporte; fenómeno que no se produjo en presencia de etanol. Estos resultados, sugirieron que la entrada de potasio a la célula, también se regula por fermentación.

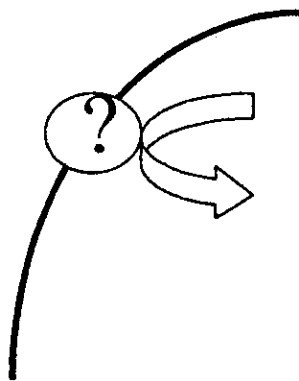
Alijo y Ramos en 1993, al trabajar con mutantes de cinasas de azúcares y con análogos de glucosa no asimilables (2-deoxiglucosa), señalaron que la entrada de potasio, cuyo mecanismo era activado por la fermentación, dependía principalmente de la fosforilación del azúcar, como señal inicial. Esta activación además, era independiente de la ruta del cAMP, de la disminución del pH_i y ni el gen TRK1 ni el TRK2 eran activados por este mecanismo.



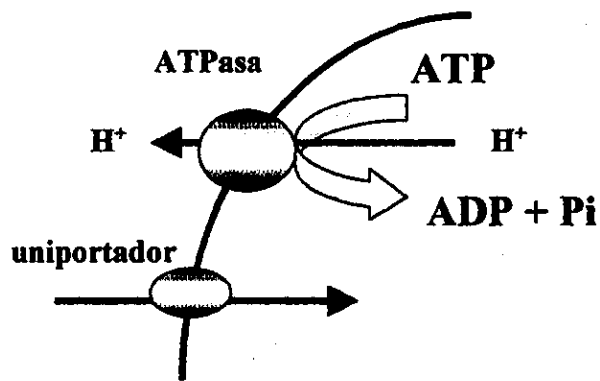
1



2



3



4

Fig. 2 Modelos alternativos para el bombeo de protones y transporte de potasio. 1: Bomba redox (Conway y cols., 1950) 2: acatreador electroneutro. 3: existencia de un intermediario (Riemersma, 1968) 4: bomba electrogénica acoplada al transporte de K^+ mediante sistemas diferentes (Peña, 1975)

La dinámica del CO₂ en la levadura.

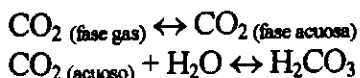
El bióxido de carbono juega un papel importante en el metabolismo celular, ya sea en la biosíntesis, en reacciones de carboxilación o como producto metabólico, a partir de reacciones de descarboxilación. En la levadura, esta molécula adquiere especial importancia, dado que durante la fermentación se producen grandes cantidades de CO₂. El CO₂, dentro de la célula se hidrata para dar H₂CO₃, el cual se ioniza a H⁺ y HCO₃⁻. Es clara la gran cantidad de H⁺ y HCO₃⁻ que se producen por este proceso; planteándose de inmediato los posibles recursos que la célula requiere, para mantener bajo control su pH interno y la electroneutralidad dentro de ciertos límites. En el estado estacionario, la relación interna de [HCO₃⁻/H₂CO₃], para un intervalo de valores de pH; de 5.8 a 6.8, varía entre 0.269:1 y 2.69:1. Estos son los valores de pH interno citoplásmico que se encuentran en presencia de un sustrato para valores externos de pH entre 4.0 y 7.0 (Cimprich y cols., 1995; Peña y cols. 1995).

Krebs y cols. (1948) y Cooper y cols. (1968) informaron que durante el metabolismo, la producción de CO₂ ocurre como CO₂(aq), aunque estos resultados entraban en conflicto con los de Conway y Donnel (1945), quienes señalaron que el producto de las carboxilasas de levaduras era directamente H₂CO₃ y no dióxido de carbono ni bicarbonato. Krebs (1948) aseguraba que bajo esas condiciones experimentales (pH 5.5, 37°C y exceso de piruvato) las diferencias en las velocidades de producción de CO₂ en ausencia o presencia de anhidrasa carbónica, indicaban que el producto de la descarboxilación del piruvato era directamente CO₂.

En la distribución de las concentraciones relativas del CO₂ en todas sus formas, dentro y fuera de la célula, participa la membrana plasmática, que actúa como una barrera de permeabilidad selectiva, prácticamente impermeable a la especie iónica HCO₃⁻, y que permite el libre acceso de moléculas neutras, como el CO₂(aq), CO₂(gas) y H₂CO₃ (Hunter, M.J., 1977; Simon, S.A. and Gutknecht, J. 1980).

Existe desde luego un equilibrio entre CO₂(aq) y CO₂(gas) por el fenómeno de deabsorción; cuando el CO₂(aq) pasa a la fase gaseosa es porque la concentración en el seno del líquido rebasa los límites de su solubilidad, estableciéndose el equilibrio entre las fases (aire-líquido), ya sea en condiciones normales, o cuando existe esta transferencia de masa por una reducción en la presión parcial del dióxido de carbono externa por algún factor ambiental (Faust, 1982). Cuando por alguna razón se pierde CO₂ celular, esto conduce a una disminución de H₂CO₃, H⁺ y HCO₃⁻, y al disminuir los H⁺, se observa un aumento en el valor del pH interno (la deshidratación conduce a un nuevo equilibrio, preferentemente a la formación de CO₂ y H₂O).

La concentración de las especies moleculares de dióxido de carbono en la fase líquida se puede describir de acuerdo con las reacciones de asociación/disociación y factores que intervienen para definir sus proporciones:



Coefficiente de solubilidad del gas
Presión parcial de CO₂



Por otro lado, la concentración de CO_2 disuelto se puede relacionar con la presión parcial externa de dióxido de carbono por medio de la ley de Henry:

$$\text{CO}_2 (\text{disuelto}) = H * p\text{CO}_2$$

donde:

$p\text{CO}_2$ es la presión parcial (atm) del gas disuelto y H es la constante de la ley de Henry, que a 30°C tiene un valor $28.57 \text{ mM CO}_2 / \text{atm}$.

La constante de equilibrio de varias reacciones de asociación/disociación, es función de los solutos y de la temperatura. Debido a que la velocidad de hidratación del CO_2 (aq) para formar H_2CO_3 es una etapa limitante; el equilibrio de este sistema de reacciones no se puede alcanzar instantáneamente. Este dato es reelevante en *S. cerevisiae*, ya que la enzima anhidrasa carbónica, que cataliza la reacción de hidratación del CO_2 , tiene poca actividad (Shoaf and Jones, 1970) o no se encuentra (resultado de nuestra investigación; datos no mostrados).

Además, el flujo neto y la concentración de CO_2 en todas sus formas a través de la membrana plasmática, dependerán de su concentración respectiva en el fluido intracelular y extracelular en el estado estacionario; por lo tanto, la concentración interna de dióxido de carbono total, es decir (CO_2 (aq), H_2CO_3 y HCO_3^-), será función del pH_i , y para valores altos del pH_i interno aumenta la contribución de la especie iónica HCO_3^- . Existe entonces una interrelación del pH_i con la concentración de dióxido de carbono, ya que los cambios en el pH_i guardan una relación directa con el movimiento pasivo del CO_2 y la disminución de ácido carbónico y bicarbonato al estar presente una carga ácida, ya sea externa o producto del metabolismo.

La célula responde a una acidificación interna aguda, reforzando varios mecanismos que eliminan H^+ , con el fin de disminuir la magnitud del cambio del pH_i interno. Un mecanismo, por ejemplo, es la conversión de un metabolito ácido débil a su base conjugada, o a un producto neutro que pueda abandonar rápidamente la célula (como el CO_2 y H_2O), resultando en una disminución de los protones intracelulares. Por su naturaleza química, el bicarbonato es uno de los mejores sistemas reguladores del pH_i , siempre y cuando los cambios en el pH_i no provengan de cambios en $p\text{CO}_2$.

Cuando se adiciona una carga ácida fuerte, la mayoría de los protones se combina con la base conjugada del ácido débil. Como resultado, existe un incremento en la concentración del ácido débil y simultáneamente una disminución de la concentración de su base conjugada. Sin embargo cuando se elimina el ácido débil, formado por la adición de protones, la base conjugada disminuye, mientras el ácido débil permanece cercano a un valor constante. En este caso, el ion bicarbonato disminuye y se forma CO_2 ; pero el exceso de CO_2 se libera al ambiente en un sistema abierto, estableciéndose un nuevo equilibrio donde la relación $[\text{HCO}_3^- / \alpha * p\text{CO}_2]$ no cambia dramáticamente. Cuando se agrega una base fuerte a la célula, ésta puede ser neutralizada por el ácido carbónico, y el CO_2 se puede reemplazar por el que se genera metabólicamente y nuevamente la relación del par amortiguador no

cambiaría mucho.

Cuando en la célula baja el pH citosólico por el aumento en la concentración de un componente que produce acidez, por ejemplo CO_2 (por cada molécula de dióxido de carbono que reacciona con el agua produce un protón y se forma un ión bicarbonato); los protones pueden ser amortiguados por proteínas y fosfatos, o bombeados por la ATPasa de protones de la membrana plasmática. Como resultado, el ion bicarbonato libre aumenta mucho más que los protones. Si por el contrario, la acidez se remueve de este sistema por disminución de la pCO_2 , el ión bicarbonato disminuye. El protón no disminuye en una proporción equivalente, ya que el resto de los reguladores se disocia para resistir el cambio de pH (Baggot, 1997)

El papel del pH interno y los aniones de ácidos débiles en la acumulación del K^+ :

Ryan y cols. (1971 y 1972), por otro lado, trabajando con ácidos orgánicos débiles que difunden a través de la membrana, propusieron que el pH intracelular era un factor importante en la regulación del transporte de potasio. La entrada de K^+ a la célula implica la salida de protones y por consiguiente que el pH interno aumente, impidiendo mayor acumulación de potasio. Considerando que el intercambio $\text{H}^+ - \text{K}^+$ es eficiente a pH ácido, la presencia de los ácidos orgánicos débiles que acidifican el citosol, facilitarán la entrada del catión en ausencia, inclusive, de una fuente de energía asimilable (Ryan, 1972).

Peña (1975), estudió el transporte de K^+ en levaduras; burbujando nitrógeno al medio para lavar el CO_2 , que se produce por fermentación, observó menor acumulación de potasio comparado a las condiciones control. Empero, si se permitía a la célula primero acumular el CO_2 , el burbujeo de N_2 , en estas condiciones, no sólo bloqueaba la entrada de potasio, sino que además experimentaba una salida que podía revertirse por el burbujeo de CO_2 al medio de incubación. Estos resultados y experimentos con diferentes ácidos orgánicos débiles, lo condujo al planteamiento de que la acidificación del medio, los aniones y la magnitud de su acumulación (requiriéndose para retener al catión en el citosol), eran importantes en el proceso de captación del potasio (Peña, 1975, Rothstein y col., 1958).

Por otro lado, aún cuando se sabe que los sistemas de transporte de potasio en la levadura se activan por la presencia de azúcares fermentables (y no por etanol), hemos observado que los productos metabólicos de la glucólisis o la respiración, en especial los aniones de ácidos débiles, son capaces de activar los sistemas de captación de K^+ (resultados de esta tesis); planteando como hipótesis que la acumulación de K^+ puede favorecerse por la generación de un gradiente de concentración de cargas negativas (aniones; principalmente bicarbonato) que no difunden, formando un potencial Donnan (Fig. 3). Como la acumulación y distribución de HCO_3^- depende de los valores relativos del pH_i y pH_e , es posible que mediante este mecanismo, indirectamente se pueda estar utilizando el gradiente de pH para acumular potasio en la levadura, sin necesidad de un simportador H^+/K^+ como el descrito para *Neurospora* (Rodríguez Navarro y cols., 1986).

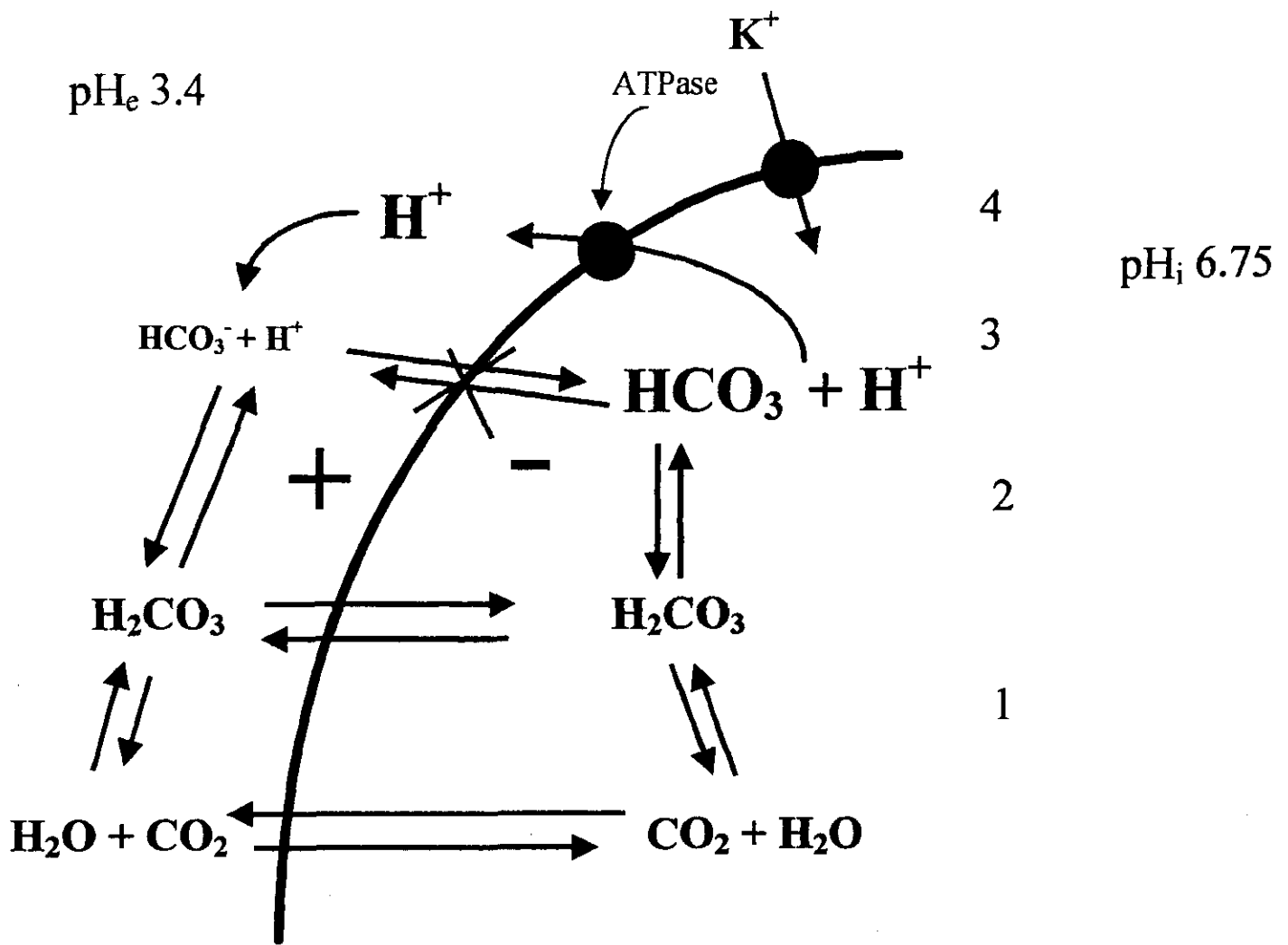


Fig. 3. Esquema representativo del efecto Donnan. (1) reacción de hidratación espontánea del CO_2 , que produce H_2CO_3 , el cual se disocia en bicarbonato y un protón (2); la ATPasa de membrana plasmática, entonces expulsa el protón (3), lo cual baja el pH externo y un aumento en el pH interno. El ácido carbónico es capaz de difundir libremente a través de la membrana plasmática, mientras el bicarbonato no. A un alto valor de pH interno, (6.75 en la Figura) la disociación del ácido carbónico se desplaza para producir bicarbonato. A un valor bajo de pH externo (3.4 en la Figura, la especie predominante es ácido carbónico. Ya que el bicarbonato no puede difundir, éste permanece adentro, generando un potencial eléctrico adicional, que puede dirigir una acumulación mayor de potasio a través de su acarreador.

OBJETIVO

Investigar el papel del bicarbonato y aniones de ácidos orgánicos débiles, productos del metabolismo, en la acumulación de K^+ en la levadura *Saccharomyces cerevisiae* y en la regulación del pH interno de la célula.

MATERIALES Y METODOS

1. Microorganismo y condiciones de cultivo.

Se utilizó la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, aislada de una colonia procedente de un producto comercial (La Azteca, S.A). Las células se cultivaron en 500 ml de medio YPD (1% de extracto de levadura, 2% de peptona y 2% de glucosa) durante 24 h en un agitador rotatorio a 250 rpm a temperatura de 30 °C. Las células se colectaron por centrifugación y se lavaron dos veces con agua destilada. El paquete celular se resuspendió en agua destilada (10%, w/v) y se aireó toda la noche durante 14 h, con el fin de disminuir el contenido de sustratos endógenos. Se ha observado que este procedimiento disminuye la concentración intracelular de iones. Al término de la incubación, las células se centrifugaron y se lavaron dos veces, para ser resuspendidas en agua a una concentración final de 0.5 g/ml y se mantuvieron en hielo durante el curso del mismo día.

2. Medida de la acumulación de iones.

Se incubaron 100 mg de células en 5ml de medio de cultivo conteniendo 100 mM de glucosa y sin agitación en 8.6 mM de etanol (con agitación para este sustrato) durante 15 minutos en un matraz Erlenmeyer en un baño de agua de temperatura controlada a 30 °C. Se agregó luego 30 mM de KCl cuando se indica en los experimentos. El medio se amortigó con 10 mM de trietanolamina (TEA) y se ajustó a pH 7.5 con ácido tartárico o se amortiguó a pH 4.5 con 10 mM de ácido tartárico, el cual se ajustó con TEA. Después de la incubación, las muestras se pasaron a un baño de hielo y rápidamente se centrifugaron durante 3 min. El sobrenadante y/o el paquete celular se utilizaron para cuantificar diferentes metabolitos. En los experimentos en que así se señala, se agregó 10 mM de ácido propiónico, ajustado al pH externo actual.

3. Determinación de CO₂.

Se agregaron 2ml de NaOH al 1% (w/v) al sobrenadante y paquete celular para fijar el CO₂ en todas sus formas. El contenido de CO₂ se midió utilizando un respirómetro de Warburg, agregando después de que se equilibró la temperatura, 0.5 ml de H₂SO₄ 2N para liberar todo el CO₂.

4. Determinación del contenido de potasio.

Las células se centrifugaron y se resuspendieron en agua destilada-desionizada y se pusieron en un baño a ebullición (92 °C) durante 30 min. Después de enfriar, la suspensión se centrifugó y las diluciones apropiadas del sobrenadante se utilizaron para la medición del K⁺ en un fotómetro de flama.

5. Distribución de ácido propiónico radioactivo.

La acumulación del propionato se midió usando $^{14}\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-COOH}$. Después de incubar las células bajo las condiciones ya mencionadas durante 10 minutos, se adicionaron las concentraciones de ácido propiónico, y después de 10 minutos más, se tomó una alícuota de la suspensión; se filtró a través de un filtro Millipore (tamaño promedio de poro de $0.45\ \mu\text{M}$) y la radioactividad se midió en un contador de centelleo.

6. Estimación del potencial de membrana.

El potencial de membrana se estimó siguiendo los cambios de fluorescencia de $0.25\ \mu\text{M}$ de cianina $\text{DiSC}_3(3)$ (ditiocarbocianina, Molecular Probes) a 540-590 nm (Peña y cols., 1984) en un espectrofluorómetro DMX-1000 (SLM Instruments) con un compartimento para muestras controlado a $30\ ^\circ\text{C}$ y un sistema de adquisición y procesamiento de datos. Se incubaron 25 mg de células (peso húmedo) en 2.0 ml del medio siguiente: 100 mM de glucosa u 8.6 mM de etanol; trietanolamina 10 mM ajustado a pH 7.5 con ácido tartárico, o ácido tartárico ajustado a pH 4.5 con TEA; $10\ \mu\text{M}$ de pentaclorofenol y $10\ \mu\text{M}$ de CaCl_2 .

7. Determinación del pH interno.

El pH interno de las células se midió a través de los cambios en la fluorescencia de la piranina (1,3,6-hidroxi-piranina 8-sulfonato) (Peña y cols., 1995; Höfer y cols., 1996) introducida por electroporación con un electroporador marca Bio-Rad con pulso controlado, utilizando un volumen de $700\ \mu\text{l}$ de suspensión celular, más $20\ \mu\text{l}$ de piranina $100\ \mu\text{M}$. Se aplicó un pulso de 1500 V con capacitancia de $25\ \mu\text{F}$ y $200\ \Omega$ de resistencia, durante aproximadamente 3.1 mseg. Las células se centrifugaron y se lavaron 3 veces con agua desionizada en una microfuga Beckman por 10 segundos, se resuspendieron a la concentración original (para tener una relación de $0.5\ \text{g/ml}$) y se emplearon como se indica en cada experimento. Los cambios de fluorescencia se registran a 460-520 nm en un espectrofluorómetro DMX-100 (SLM Instruments, Urbana, II.) con un compartimento para muestras a temperatura controlada ($30\ ^\circ\text{C}$) (Calahorra y cols., 1998).

Método de cálculo: La forma ionizada de la piranina es fluorescente a 460-520 nm. El pH se relaciona a la constante de disociación por medio de la ecuación de Henderson-Hasselbalch [$\text{pH} = \text{pK} - \log(\text{forma disociada}/\text{forma protonada})$], por tanto, el pH (del ambiente donde se encuentra la piranina) se puede evaluar a partir de los cambios registrados en la fluorescencia como sigue:

La cantidad de piranina interna disociada, es la señal de fluorescencia total, menos la señal de fluorescencia de piranina externa (observada inmediatamente después de la adición de las células, antes de cualquier contribución del metabolismo) además se resta, la pequeña fluorescencia observada después de acidificar con ácido propiónico.

La cantidad de piranina interna total, es la medición de la fluorescencia utilizando Tris (para obtener la disociación completa), menos la fluorescencia de la piranina externa en su forma disociada (para un pKa de 7.2, la corrección deberá ser un factor de 1.16, para la fluorescencia observada inmediatamente después de la adición de las células a el medio con pH 8.0, ya que a este pH externo, de acuerdo a la ecuación de Henderson-Hasselbalch, 86% de la piranina está ionizada) (Peña y cols., 1995).

8. Determinación del pH externo.

El pH externo se midió siguiendo los cambios en el medio con un electrodo de pH conectado a un potenciómetro. La mezcla de incubación se describe en cada experimento.

9. Respiración.

Se midió siguiendo el consumo de oxígeno con glucosa o etanol como sustratos a pH 4.5 y 7.5. La mezcla de incubación se mantuvo a temperatura constante en un recipiente de vidrio cerrado y termoestabilizado a 30 °C, con agitación para obtener una adecuada distribución de las células de levadura y del oxígeno. El consumo de oxígeno se midió con un electrodo de oxígeno Clark conectado a un polarizador y un sistema de registro conectado a una computadora. Las condiciones experimentales se describen en la figura correspondiente.

10. Activación de la ATPasa de membrana plasmática por bicarbonato o propionato.

Se permeabilizaron células de acuerdo con el método descrito por Ulaszewski y cols. (1983) como sigue: las células (10-6 células/ml) se incubaron en 4 ml de medio que contenía 2% de glucosa, 2% de extracto de levadura, 1% de peptona de gelatina por 12 horas a 30 °C. Las células se centrifugaron y se resuspendieron en 25 vol. de KCl 100 mM, 4 mM de MgCl₂; 8 mM de regulador imidazol/HCl pH 6.5. Se adicionó un volumen de mezcla de permeabilización al paquete celular (igual a 1.25) y se mezcló durante pocos segundos en un vortex. La mezcla de permeabilización contenía 1 vol. de tolueno, 4 vol. de etanol y 1 vol de tritón X-100. Después de la centrifugación, el paquete celular se resuspendió en 5 vol de sorbitol al 10% y se lavó. La actividad de ATPasa se midió con 30 µl de esta suspensión durante 30 minutos a 30 °C en 1ml de: 6 mM de ATP, 12 mM de MgCl₂, 50 mM de regulador Mes pH 6.0, 0.2 mM de KCl y 10 mM de NaN₃. La reacción se detiene con 100 µl de ácido tricloroacético y se mide el fosfato inorgánico liberado por método colorimétrico, utilizando una modificación del método de Fiske y Subbarow (1925). Esta reacción se incuba 5 minutos y se inicia con la adición de 250 µl de una solución que contenía 12 g de molibdato de amonio, 28 ml de H₂SO₄, 40 g de SDS, 1 l de agua, posteriormente se agrega 250 µl de ELON. Se preparó un estándar de fosfato para cada ensayo. Después de 15 minutos se midió la intensidad de color a una longitud de onda a 700 nm en un espectrofotómetro Shimadzu UV 160A.

Otro método adicional utilizado para cuantificar la activación de la ATPasa fue el sistema de

regeneración de ATP, siguiendo la desaparición de NADH a 340 nm en un espectrofotómetro de doble longitud de onda SLM, modelo DW2; conversión de On-Line Instruments Systems Inc. conectado a un sistema de almacenamiento y procesamiento de datos. Los experimentos cinéticos se llevaron a cabo dentro de una cámara con agitación a 30 °C en un volumen de 2 ml total de la mezcla de reacción conteniendo: 10 mM de NaN_3 , 20 mM KCl, 1 mM MgCl_2 , 2 mM PEP (fosfoenolpiruvato), 7 U/ml de LDH (lactato deshidrogenasa), 2 mM de ATP (disuelto en 10 mM de regulador Mes pH 6.0), 0.2 mM NADH (disuelto en 10 mM de regulador Mes pH 6.0 preparado al momento de su uso), 10 U/ml PK (piruvato cinasa), regulador Mes 10 mM pH 6.0 y diferentes concentraciones de suspensión de células permeabilizadas o de membranas plasmática (0-20 μl). Se adicionaron diferentes concentraciones de bicarbonato de sodio (0 - 100 mM) ajustado con HCl a pH 6.5 y 6.0 ó diferentes concentraciones de ácido propiónico-TEA ajustado a los mismos pHs. La reacción se inició por la adición de ATP.

La membrana plasmática se preparó de acuerdo al método descrito por Calahorra y cols. (1987), que en breve consistió en: 4 g de células resuspendidas en un medio que contenía: 20 ml de sorbitol 1 M, 50 mM de K_2HPO_4 , EDTA 1 mM, pH 7.4, 1 $\mu\text{l/ml}$ de β -mercaptoetanol ó 10 mM de DTT e incubadas durante 10 minutos a 30 °C. Posteriormente se añadió 1000 U/g de liticase ó 0.6 mg/g de zimoliasa y se incubó a 30 °C. Se monitoreó la formación de protoplastos (tomando 20 μl de la muestra diluyéndola en 3 ml de agua) registrando turbidez a 550 nm c/15 min. hasta obtener una disminución del 10% en D.O. Después se le añadió PMSF a concentración final de 1 mM, y se rompieron las células en frío por sonicación con intervalos de 15 seg hasta completar 1 min. Se centrifugaron por 10 minutos a 3500 rpm. El sobrenadante se volvió a centrifugar a 18,000 rpm 30 min. De aquí nuevamente se recuperó el sobrenadante y se centrifugó a 18,000 rpm durante 45 min, (se retiró la nata formada) y se lavó el precipitado con una solución de 30 mM de EGTA- Tris 1 mM pH 7.2 con ayuda de un homogenizador, se centrifugó a 18000 rpm 45 min. El precipitado se resuspendió ayudándose de una varilla de vidrio en 1 ml de la misma solución. La actividad enzimática se midió como se indica en el apartado 4.10.

11. Actividad de la anhidrasa carbónica.

Se prepararon extractos celulares como lo indican Funayama y cols. (1980): 100 mg del paquete celular cosechado en fase logarítmica se resuspendió en 0.5 ml de amortiguador 20 mM de imidazol, 20 mM de Tris, 1 mM EDTA, 1 mM de mercaptoetanol, 2 mM PMSF pH 8.0 y 1.5 g de perlas de vidrio de 0.5 mm. Se rompió en frío, en un vortez, por períodos de un minuto y 1 minuto de reposo en hielo (por un total de 20 minutos); se centrifugó a 25,000 g durante 15 minutos.

La actividad de anhidrasa carbónica se cuantificó por un método colorimétrico, que consistió en lo siguiente: 3 ml de la mezcla de reacción (10 mM de amortiguador de trietanolamida pH 8.0, colorante azul de bromotimol a una D.O de 0.7 y 300 μl de extracto celular), se le adicionó 500 μl de agua saturada con CO_2 el cambio de color que acompaña el cambio en el pH de la solución se registró a 620 nm en un espectrofotómetro (de doble haz) con agitación y temperatura controlada a 30 °C.

Con la finalidad de saber si durante el proceso de extracción nuestra enzima no era degradada, se midió paralelamente actividad de alcohol deshidrogenasa en el mismo extracto, la cual es una enzima citosólica. Como control positivo de anhidrasa carbónica, se utilizó un lisado de eritrocitos; los cuales se prepararon de acuerdo a Keilin y col. (1940): el paquete glubular se lavó 3 veces con 0.9% de NaCl y se homogeneizaron con agua destilada. A 10 ml de este lisado se le adicionó rápidamente 8 ml de etanol al 40 % y 4 ml de cloroformo, se agitó y se centrifugó 3 minutos a 3500 rpm, recuperando el primer sobrenadante que es la solución enzimática.

RESULTADOS

La cuantificación del contenido iónico y otros parámetros se llevó a cabo después de 15 minutos de incubación, una vez que las células habían alcanzado el estado estacionario y no existían cambios importantes en la acumulación neta de iones. Los resultados de la Tabla 1 muestran, que el contenido de CO_2 en las levaduras incubadas en presencia de glucosa fue mayor que cuando se usó etanol como sustrato.

Tabla 1. Acumulación de CO_2 ^a a diferentes valores del pH externo, con glucosa o etanol como sustrato.

pH externo inicial	4.5			7.5		
	sin KCl	con KCl	c/KCl - s/KC (%)	sin KCl	con KCl	c/KCl - s/KC (%)
Glucosa	150 ± 3.5	185 ± 2.1	35 (23)	173 ± 3.1	218 ± 2.57	45 (26)
Etanol	43 ± 2.1	56 ± 2.5	13 (30)	35 ± 3.2	43 ± 4.3	8 (23)

100 mg de células se incubaron en 5 ml de un medio con 100 mM de glucosa sin agitación, o bien etanol 8.6 mM, con agitación en un matraz Erlenmeyer de 25 ml, KCl 30 mM (cuando se indica). El medio se amortiguó con TEA (trietanolamina) 10 mM ajustado a pH 7.5 con ácido tartárico, o ácido tartárico ajustado con TEA a pH 4.5. Las células se incubaron 15 min. a 30 °C en un baño de agua de temperatura controlada. Después de la incubación la suspensión celular se centrifugó y el sobrenadante y/o el paquete celular se utilizó para las mediciones de CO_2 .

^aLa concentración de CO_2 se expresa como mM de $\text{HCO}_3^- + \text{CO}_2$. La desviación estándar fue menor del 10% en 7 ensayos por duplicado. Los valores en paréntesis indican el porcentaje de aumento en la concentración de CO_2 con KCl. De acuerdo con resultados anteriores, para los cálculos de la concentración interna, se utiliza como valor del agua interna, la mitad del peso húmedo en ml. (Peña y cols., 1967). El análisis estadístico indica una $P < 0.001$ en glucosa

Se consideró importante llevar a cabo experimentos en condiciones de pH ácido y alcalino, ya que la distribución relativa del ácido carbónico y bicarbonato entre el medio y el interior celular debe ser diferente. En los experimentos sin potasio en el medio, cuando el pH inicial del medio fue de 7.5, con glucosa como sustrato, se observó una mayor acumulación interna de CO_2 que cuando el pH fue ácido; con etanol por el contrario, a pH inicial alcalino, la acumulación fue ligeramente menor. Con potasio en el medio, la concentración interna de CO_2 aumentó en ambas condiciones de pH y sustratos, comparados con los controles sin K^+ , no obstante que el K^+ no estimula la fermentación ni la respiración a pH alcalino (Rothstein y Demis, 1953; Peña y cols., 1972).

Aunque el aumento de CO_2 (alrededor del 26%) fue similar a ambos valores de pH y sustratos, el aumento en valores absolutos, fueron mayores con glucosa (35 y 45 mM) que con etanol (13 y 8 mM).

Los experimentos descritos en la Tabla 2 muestran que las células, en presencia de potasio acumularon diferentes cantidades de éste catión, cuando se incubaron con glucosa o etanol. Sobre la base del contenido inicial de potasio (misma concentración que en la condición control), en pH ácido e incubadas con glucosa, las células acumularon 264 mM (equivalente a un aumento de 36 %), mientras que con etanol, se acumuló 240 mM (equivalente a 29 %); en pH alcalino, la acumulación fue 266 mM (38 %) y 220 mM (13 %) en glucosa y etanol respectivamente. Es decir en valores absolutos, con glucosa la acumulación de potasio (70 mmoles) fue mayor que con etanol (54 mmoles). Por otro lado, mientras la concentración de potasio fue mayor con glucosa (con un aumento de 74 mmoles), en condiciones de alcalinidad con etanol, apenas es de 26 mmoles, encontrando diferencia estadística significativa entre el grupo de glucosa y etanol en ambos valores de pH ($p < 0.001$).

Tabla 2. Cambios de la concentración de potasio intracelular (mM) en diferentes condiciones experimentales

pH externo inicial	4.5			7.5		
	sin KCl	con KCl	c/KCl - s/KC (%)	sin KCl	con KCl	c/KCl - s/KC (%)
Glucosa	194 ± 1.4	264 ± 1.9	70 (36)	192 ± 3.14	266 ± 1.34	74 (38)
Etanol	186 ± 3	240 ± 2.1	54 (29)	194 ± 2.26	220 ± 1.9	26 (13)

Las condiciones experimentales fueron similares a las de la Tabla 1. La desviación estándar fue menor del 10% en 3 experimentos. Los valores en paréntesis son el porcentaje de aumento con KCl sobre la base de la condición control. El análisis de varianza indica una $P < 0.001$ entre los gpos glucosa/etanol bajo la misma condición de pH.

Sin K^+ en el medio, después de 15 minutos de incubación a pH ácido, las células incubadas con etanol, mostraron una ligera pérdida de K^+ , mientras que a pH alcalino y con glucosa, en ambos pHs, el contenido de potasio se mantuvo la misma concentración 194 mM; el contenido de potasio, en las células después del ayuno, es la misma concentración que la registrada en la condición sin K^+ en el medio (datos no mostrados).

Es necesario subrayar que el contenido de ATP fue mayor con glucosa que con etanol como sustrato (en resultados promedio de dos experimentos diferentes); medido en ausencia de K^+ , 3.1(moles/ g de célula) con glucosa y 2.1(moles/ g de célula) con etanol; y en presencia de K^+ 2.75 y 2.0 (moles/ g de célula) para glucosa y etanol, respectivamente.

Como muestran las Tablas 1 y 2, el contenido de CO_2 y K^+ aumentó tanto con glucosa como con etanol en la misma dirección que el K^+ , siendo mayor para potasio y no observándose proporción de 1:1.

Se consideró importante medir el pH interno para correlacionar los datos de K^+ con la distribución de CO_2 .

La tabla 3 muestra los valores de pH interno de las células, al minuto 2.5 y al final de la incubación, en cada condición experimental, utilizando el método descrito en materiales y métodos (Peña y cols. 1995). Los resultados corresponden a pH del citoplasma y no al de otro organelo.

Tabla 3: Valores de pH interno de células incubadas con glucosa y etanol, obtenidos a partir de la fluorescencia de la piranina, después de 2.5 y 15 minutos de incubación

pH _{inicial externo}	4.5		7.5	
	sin KCl	con KCl	sin KCl	con KCl
Glucosa (2.5 min.)	6.20 ± 0.05	6.75 ± 0.05	6.70 ± 0.05	6.95 ± 0.07
Glucosa (15 min)	6.22 ± 0.02	6.55 ± 0.13	6.80 ± 0.04	6.75 ± 0.02
Etanol (2.5 min)	5.9 ± 0.05	5.97 ± 0.02	6.1 ± 0.15	6.2 ± 0.05
Etanol (15 min)	5.90 ± 0.03	6.30 ± 0.02	6.55 ± 0.02	6.70 ± 0.02

25 mg de células se incubaron en el medio como sigue: 10 mM del regulador tartrato-TEA, pH 4.5 o regulador TEA-tartrato, pH 7.5; 100 mM de glucosa u 8.6 mM de etanol. Previamente se electroporó la piranina a las células como se describe en materiales y métodos. Los cambios en a fluorescencia se midieron a 460-520 nm en un espectrofluorómetro a 30°C. El valor de pH se calculó como lo describe Peña y cols.(1995). Los valores se obtuvieron después de la incubación de 15 min.

Como se observa en la Tabla 3, Bajo condiciones ácidas (pH inicial externo de 4.5), sin K^+ en el medio, el pH intracelular con glucosa es de 6.22 y con etanol de 5.9: en presencia de potasio es de 6.55 y 6.3 respectivamente. En condiciones alcalinas (pH inicial externo de 7.5), sin potasio, el pHi es de 6.8 con glucosa y 6.55 con etanol; con potasio en el medio, es de 6.75 y 6.7 para glucosa y etanol. Esto es, el valor de pH celular interno, bajo condiciones comparables, a pH 4.5, es más ácido con etanol que con glucosa, e incluso esta situación es más clara a los 2.5 min. de incubación, en ambos valores de pH, a pesar de que con glucosa se genera una alta concentración de CO_2 y consecuentemente ácido carbónico.

Por otro lado, al calcular los valores de pH interno de la célula, utilizando la distribución de ácido carbónico y bicarbonato (Tabla 4), se obtienen valores más altos que los calculados por cambios en la fluorescencia. El pH interno calculado de ésta forma, es mayor en las dos condiciones de pH externo y sustratos. Esto es, pHi sin potasio en el medio y condiciones ácidas: es 7.9 y 8.0; e incubadas con potasio, 8.0 y 7.5, para glucosa y etanol respectivamente. En condiciones alcalinas: sin potasio, 6.8 y 6.55; con potasio, 6.75 y 6.7 con glucosa y etanol respectivamente.

Tabla 4. Valores de pH interno celular calculados a partir de la distribución de CO₂ y pH del medio al final de la incubación.

pH _{externo} inicial	4.5		7.5	
	sin KCl	con KCl	sin KCl	con KCl
Glucosa	7.9	8.0	7.8	8.0
Etanol	8.0	8.5	8.7	8.9

Incubación: 100 mg de células en 5 ml de medio con de glucosa 100 mM sin agitación, o bien 8.6 mM de etanol agitando en un matraz Erlenmeyer de 25 ml de capacidad; se agregó KCl 30 mM cuando se indica. El medio se amortiguó con 10 mM de TEA (trietanolamina) ajustada a pH 7.5 con ácido tartárico, o ácido tartárico ajustado con TEA a pH 4.5. Las células se incubaron 15 minutos a 30°C en un baño de temperatura controlada. Después de la incubación la suspensión celular se centrifugó y el sobrenadante y/o el paquete celular se utilizaron para la medición de CO₂ y pH externo (Tabla 5), para calcular la distribución de H₂CO₃ y HCO₃⁻ internos y externos, y de aquí el pH interno por la ecuación de Henderson Hasselbalch. El valor de pKa del carbónico que se tomó fue 6.35. Los resultados se obtuvieron de los datos de las Tablas 1 y 5.

La Tabla 5 muestra la distribución de CO₂ de acuerdo con el pH intracelular, de células incubadas en condiciones de acidez o alcalinidad, con glucosa como sustrato, tomando los datos de la Tabla 1.

Como podemos observar, la concentración de boicarbonato fue mayor que la de ácido carbónico, en ambas condiciones de pH con y sin potasio en el medio. Al comparar la concentración de bicarbonato a los diferentes pHs, se observó mayor concentración en condiciones iniciales de alcalinidad. Lo mismo que el Δ CO₂, con potasio en el medio, pero ligeramente para ΔKCl.

Tabla 5. Concentraciones de bicarbonato y ácido carbónico (mM) de células de levadura incubadas con glucosa a pH 4.5 y 7.5 con y sin la adición de KCl.

pH inicial	4.5		7.5	
	Acido carbónico	Bicarbonato	Acido carbónico	Bicarbonato
con KCl	41	114	23	165
sin KCl	43	77	37	106
Δ CO ₂ con KCl	-2	37	-14	59
**ΔKCl		110		122

Los resultados fueron calculados de los datos de la Tabla 1 y los valores obtenidos para el pH interno de las células por la fluorescencia de la piranina (y restando el valor de CO₂ soluble).

* Δ diferencia en valores absolutos del contenido (mM) de bicarbonato o ácido carbónico en presencia o ausencia de potasio a diferentes condiciones de pH

** Δ diferencia en valores absolutos de K⁺ acumulado en presencia de KCl a diferentes condiciones de pH (datos de la Tabla 2) en glucosa.

Durante la fermentación, las células de levadura acidifican notablemente el medio. La Tabla 6 muestra los valores de pH externo de la suspensión celular, después de 15 minutos de incubación. Con etanol, como sustrato, el cambio del pH del medio por la acción metabólica, en ambas condiciones de pH inicial, no fue drástico; es decir, en condiciones de acidez (pH 4.5), la disminución en el pH fue hasta 4.4 sin K⁺, 4.3 con K⁺ en el medio; y en alcalinidad (pH 7.5) 6.6 sin K⁺ y 6.7 con K⁺. En glucosa, el cambio es notable particularmente en presencia de potasio; a pH 4.5, en la condición control el pH externo fue 4.4 y con potasio de 3.9; a pH 7.5, en ausencia del catión fue de 5.7 y en su presencia de 5.3.

No obstante, la presencia de un amortiguador, hubo una acidificación importante del medio, que representa un gradiente significativo de pH a través de la membrana celular. Además, la disminución del pH externo fue mayor cuando la condición inicial de pH fue 7.5 (particularmente con glucosa como sustrato); esto puede explicarse, debido a que existe mayor actividad del bombeo de protones a pH alcalino, de acuerdo con los resultados de Peña y cols. (1972). Aún cuando en agua pura, se requiere una cantidad más grande de H⁺ para cambiar el pH de 4.5 a 3.4 (2.85 x 10⁻⁴ moles.lt⁻¹) que de 7.5 a 5.3 (4.98 x 10⁻⁶ moles.lt⁻¹), los experimentos aquí descritos, se llevaron a cabo en presencia de un amortiguador, y por titulación se pudo comprobar que la disminución del pH en condiciones alcalinas, representa una cantidad de protones bombeados mayor que a pH ácido (datos no mostrados).

Tabla 6: Valores de pH externo después de 15 minutos de incubación con glucosa o etanol como sustratos.

pH externo inicial	4.5		7.5	
	sin KCl	con KCl	sin KCl	con KCl
Glucosa	4.4 (0.06	3.4 (0.2	5.7 ± 0.1	5.3 ± 0.1
Etanol	4.4 ± 0.07	4.3 ± 0.1	6.6 ± 0.07	6.7 ± 0.2

100 mg de células se incubaron en las mismas condiciones experimentales de la Tabla 1. Los resultados son el promedio de 3 experimentos diferentes, con una desviación estándar menor a 10%.

Con los datos de las Tablas 3 y 6, obtuvimos la diferencia entre el pH del citosol y el del medio, al término de la incubación en cada condición experimental como se muestra en la Tabla 7.

Tabla 7. Diferencia de pH entre el interior y exterior celular de *S. cerevisiae* después de 15 minutos de incubación.

pH inicial		4.5		7.5	
		sin KCl	con KCl	sin KCl	con KCl
Glucosa	pH _{interno}	6.2	6.6	6.8	6.8
	pH _{externo}	4.4	3.4	5.7	5.3
	Δ pH	1.8	3.2	1.1	1.5
Etanol	pH _{interno}	5.9	6.3	6.6	6.7
	pH _{externo}	4.4	4.3	6.6	6.7
	Δ pH	1.5	2.0	0.0	0.0

Los resultados fueron calculados de los datos de las Tablas 3 y 6.

Como se muestra en la Tabla 7, observamos que el Δ pH fue mayor en glucosa que con etanol, tanto a pH de 4.5 y 7.5 como en presencia o ausencia de potasio en el medio. En glucosa, en condiciones de acidez, el Δ pH fue mayor que en alcalinidad. La presencia de KCl en el medio favorece un aumento en el Δ pH en ambos sustratos y valores iniciales de pHs, excepto con etanol en condiciones alcalinas

La Tabla 8 muestra que cuando el sustrato fue glucosa, en presencia de 30 mM de K⁺, la adición de concentraciones diferentes de ácido propiónico no modificó la acumulación de K⁺ en ambos valores de pH. Por otro lado, al utilizar etanol, se observó un aumento significativo ($p < 0.001$) en la acumulación del catión, alcanzando un máximo, al agregar alrededor de 10 mM de propiónico; a pH 4.5, de 258 a 309 mM; y a pH 7.5, de 248 a 309 mM.

Tabla 8: Efecto del ácido propiónico en la acumulación de potasio (mM) en células incubadas con glucosa o etanol como sustratos a diferente pH del medio.

pH inicial externo	4.5	7.5	4.5	7.5
mM Ac. Prop.	Glucosa		Etanol	
	0	304 ± 3.16	314 ± 5.6	258 ± 2.1
5	304 ± 6.20	314 ± 3.2	277 ± 2.15	293 ± 2.26
10	309 ± 5.10	310 ± 3.24	309 ± 3.9	290 ± 3.1

Se incubaron 100 mg de células con 30 mM de KCl, durante 10 minutos como se describe en la Tabla 1, y después se adicionó ácido propiónico, continuando la incubación por 5 minutos más. Las células se centrifugaron y la concentración interna de potasio se midió como se describe en materiales y métodos. Los resultados son el promedio de 3 experimentos.

* Se burbujeó CO₂ en agua durante 30 minutos en baño de hielo, la concentración que se añadió en los ensayos equivale a 3 mM de CO₂, medido con el respirómetro de Warburg.

El efecto del ácido propiónico sobre la acumulación de CO₂, en células cultivadas con glucosa o etanol a pH ácido o alcalino, se puede observar en la Tabla 9. La adición de ácido propiónico a 5 ó 10 mM, en células incubadas con glucosa, provoca disminución en la acumulación de CO₂ independientemente del pH inicial (4.5 ó 7.5). Aunque a pH de 7.5 la acumulación de CO₂ siguió siendo mayor que a pH 4.5. Cuando las células fueron incubadas con etanol, la acumulación del CO₂, también se vió afectada por la adición de ácido propiónico, provocando su disminución. Los niveles de CO₂ fueron significativamente menores, en función del sustrato utilizado, siendo de 3 a 4 veces menores en etanol que en glucosa.

Tabla 9: Efecto del ácido propiónico en la acumulación de CO₂ (mM) en células incubadas con glucosa o etanol como sustratos a distintos valores de pH en el medio.

pH inicial externo	4.5	7.5	4.5	7.5
mM Ac. Prop.	Glucosa		Etanol	
	0	185 ± 2.11	218 ± 2.57	57 ± 2.5
5	127 ± 3.1	171 ± 5.2	56 ± 6.22	28 ± 3.2
10	118 ± 3.5	189 ± 7.1	42 ± 2.1	30 ± 3.1

Se incubaron 100 mg de células como se describe en la Fig. 1 durante 10 minutos y después se le adicionó 10 mM de ácido propiónico, continuando la incubación durante 5 minutos más. Las células se centrifugaron y se midió la concentración interna de CO₂ como se describe en Materiales y Métodos. Los resultados son el promedio de tres experimentos.

Por otro lado, se observó que el ácido ^{14}C -propiónico se acumula, prácticamente, igual en glucosa o etanol como sustratos (Tabla 10). Es decir, en ambos sustratos e iguales condiciones de pH externo, la acumulación fue alrededor de 20 mM. Al final del experimento, se midió el pH externo siendo de 3.9 ± 0.2 y pH interno alrededor de 5.9 ± 0.08 , resultando muy parecido en las cuatro condiciones experimentales.

Tabla 10: Acumulación de ^{14}C -propiónico (mM) en células de levadura con glucosa o etanol como sustratos a diferentes valores de pH.

pH _{externo inicial}	4.5		7.5	
	sin KCl	con KCl	sin KCl	con KCl
Glucosa	19 ± 3	22 ± 3	19 ± 3	23 ± 4
Etanol	21 ± 4	25 ± 2	20 ± 3	22 ± 2

100 mg de células se incubaron como se describe en la Fig.1 durante 10 minutos, después se adicionó 10 mM de ácido propiónico radioactivo, continuando la incubación durante 10 minutos más. Entonces las células fueron filtradas y la radioactividad se midió en un contador de centelleo. Los resultados son el promedio de tres experimentos.

Bajo nuestras condiciones experimentales, la diferencia de potencial transmembranal debiera ser más pequeña con etanol, lo cual permitiría a la célula acumular una menor cantidad de aniones. Para explorar esta posibilidad, se decidió estimar este parámetro siguiendo la fluorescencia de la cianina DiSC₃(3). Lo que se esperaría es que con etanol como sustrato, la diferencia de potencial transmembranal aumentara por la adición de propionato.

Como muestra la Figura 4, primero, la fluorescencia con etanol fue menor, y segundo, la adición de propionato produce un aumento en la señal con este sustrato. Con glucosa hay mayor diferencia del potencial en la membrana y la adición de propionato, como se esperaba, no muestra cambio apreciable en el potencial de membrana (manifiesto por el cambio en la fluorescencia de la cianina).

Aún cuando se sabe que el ácido propiónico no es metabolizado por la mayoría de las levaduras (Borst-Pauwels, 1981), se hicieron experimentos midiendo respiración para descartar la posibilidad de que el aumento en el potencial de membrana se debiera a estimulación mitocondrial, por la presencia del ácido. Con etanol o glucosa, como sustratos, la respiración no se altera por la adición de 10 mM de ácido propiónico para ninguna condición de pH del medio; con etanol, en todo caso, el ácido tiende a inhibir un poco la respiración (los datos no se muestran).

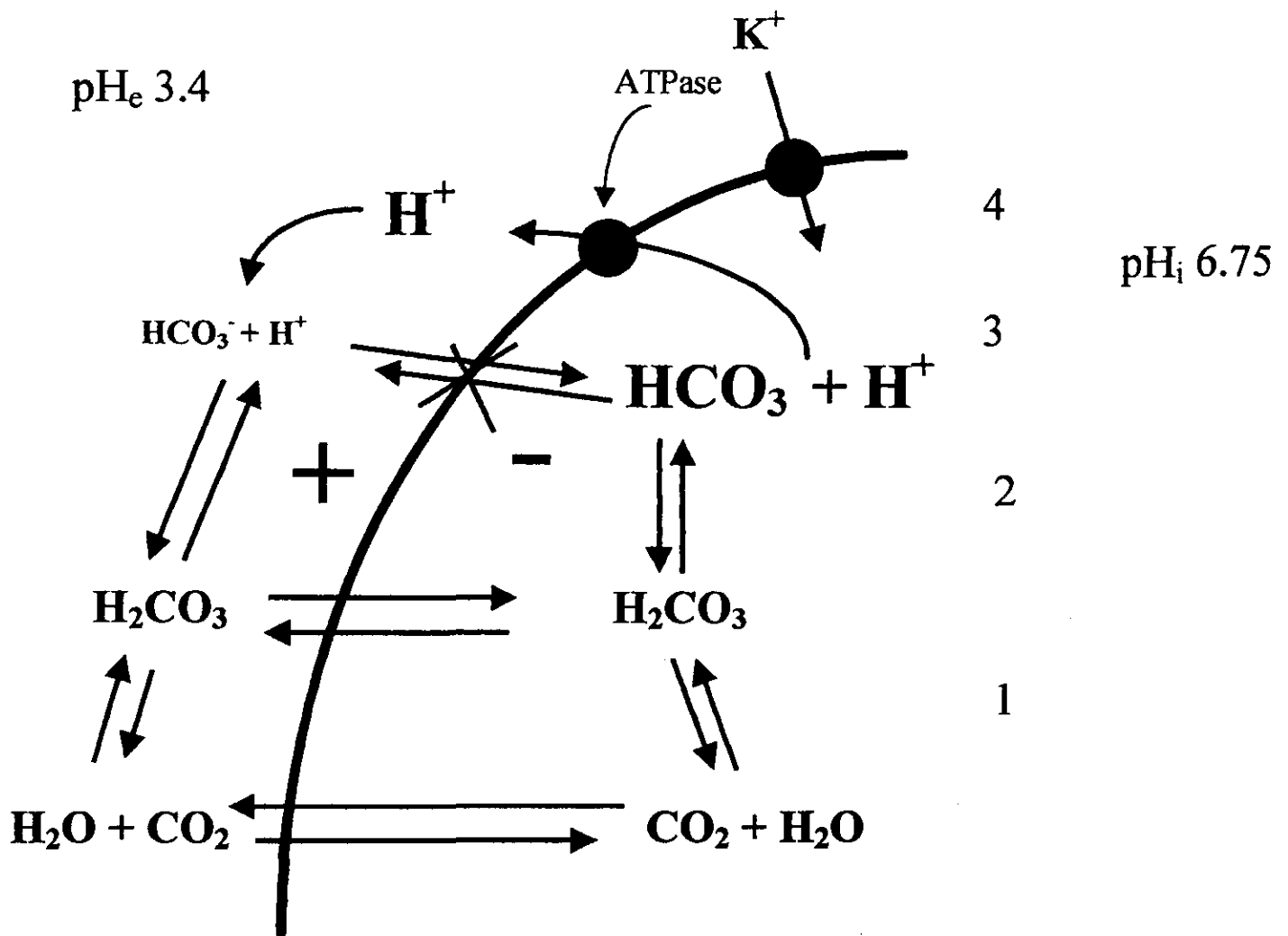


Fig. 3. Esquema representativo del efecto Donnan. (1) reacción de hidratación espontánea del CO_2 , que produce H_2CO_3 , el cual se disocia en bicarbonato y un protón (2); la ATPasa de membrana plasmática, entonces expulsa el protón (3), lo cual baja el pH externo y un aumento en el pH interno. El ácido carbónico es capaz de difundir libremente a través de la membrana plasmática, mientras el bicarbonato no. A un alto valor de pH interno, (6.75 en la Figura) la disociación del ácido carbónico se desplaza para producir bicarbonato. A un valor bajo de pH externo (3.4 en la Figura, la especie predominante es ácido carbónico. Ya que el bicarbonato no puede difundir, éste permanece adentro, generando un potencial eléctrico adicional, que puede dirigir una acumulación mayor de potasio a través de su acarreador.

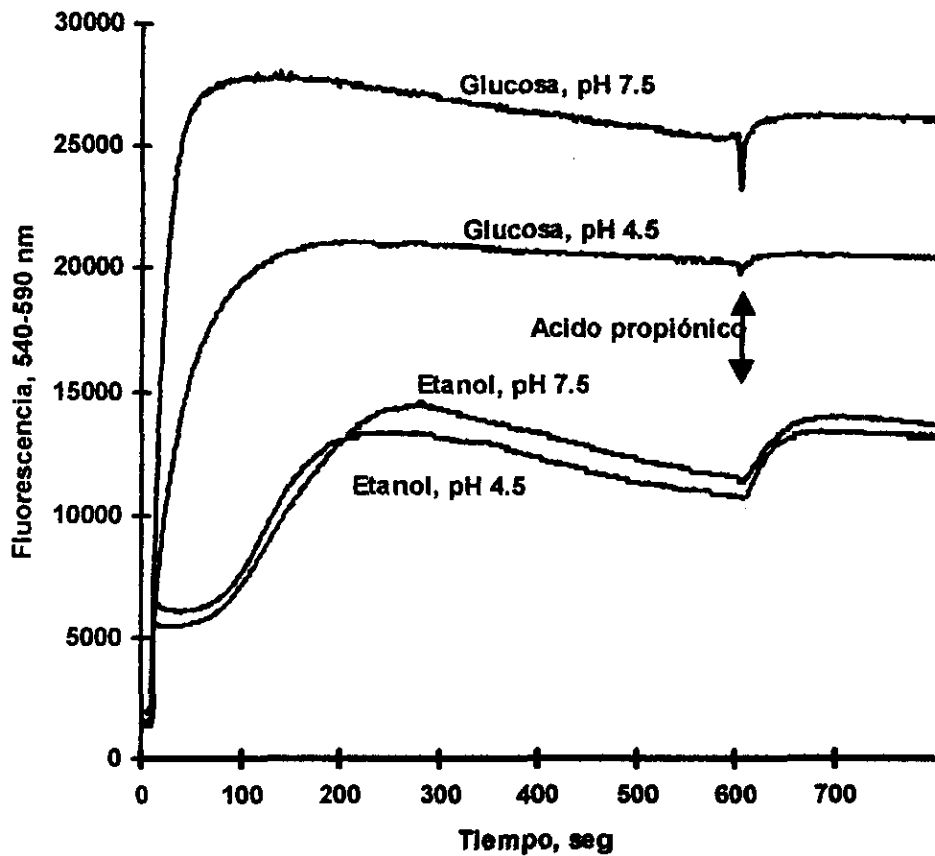


Fig. 4 Cambios en el potencial de membrana producidos por la adición de ácido propiónico en las células incubadas con etanol o con glucosa como sustratos. 25 mg de células se adicionó al siguiente medio: glucosa 100 mM o etanol 8.6 mM; trietanolamina 10 mM, ajustado a pH 7.5 con ácido tartárico, o ácido tartárico 10 mM ajustado a pH 4.5 con trietanolamina; pentaclorofenol 10 μ M; cloruro de calcio 10 μ M (Peña y col., 1984). El volumen final fue de 2 ml, temperatura de 30 °C. Cuando se indica, se adicionó 10 mM de ácido propiónico.

DISCUSION

Acumulación de CO_2 y K^+ en condiciones ácidas y alcalinas.

Los datos obtenidos como se muestra en la tabla 1 concuerdan, en general, con los de Conway y Brady (1950) y Peña y cols. (1969); es decir, que la presencia de K^+ promueve el aumento de la concentración de CO_2 , tanto en glucosa como en etanol. Sin embargo aunque el aumento de estos iones ocurre en la misma dirección, la relación estequiométrica entre el anión bicarbonato y los iones potasio no fue 1:1 como lo sugirieron Conway y O'Malley en 1946, ésta diferencia podría deberse a que en nuestras condiciones experimentales las mediciones se realizaron en el estado estacionario mientras que ellos determinan sus valores inmediatamente después de adicionar la glucosa, lo cual influye en el pH celular, como lo observamos en la Tabla 3. La concentración de potasio interno fue alrededor de 266 mM y la concentración de CO_2 fue alrededor de 200 mM, como se observa en las Tablas 1 y 2. La célula puede ser capaz de retener una alta concentración de CO_2 y la forma de retención sería como $\text{H}_2\text{CO}_3/\text{HCO}_3^-$, ya que de acuerdo a Krebs y cols. (1948) la producción de CO_2 ocurre como $\text{CO}_{2(\text{aq})}$ el cual se hidrata para dar H_2CO_3 y en función del pH existente se ioniza para formar HCO_3^- .

Nosotros calculamos que llega existir hasta 165 mM de bicarbonato, como se observó en la Tabla 5. La gran cantidad de bicarbonato detectado en la célula, pareciera también sugerir que ésta debe tener un mecanismo capaz de compensar el efecto adverso de éste anión sobre la actividad de algunas enzimas, además de mantener así la electroneutralidad y su pH interno. La concentración del bicarbonato acumulado por las células en condiciones ácidas o alcalinas, puede obedecer a varios mecanismos y uno de ellos sería la movilidad del H_2CO_3 a través de la membrana, por difusión simple de la forma protonada, donde su distribución dependerá de la ionización del H_2CO_3 y de los valores del pH interno y externo, los datos obtenidos de la tabla 5 parecen apoyar efectivamente que la acumulación de bicarbonato y de H_2CO_3 depende del pH, observando mayor concentración de bicarbonato a pH alcalino y mayor concentración de H_2CO_3 a pH ácido, los cuales estarían además influenciados por la actividad de la H^+ -ATPasa de la membrana, la cual expulsa protones desde el interior de la célula. A pesar de esto, la explicación a la distribución del par $\text{H}_2\text{CO}_3/\text{HCO}_3^-$, en la célula, no parece simple. Al medir los valores del pH mediante un indicador fluorescente (piranina), o por la distribución del par $\text{H}_2\text{CO}_3/\text{HCO}_3^-$, se encontró diferencia entre ellos. Mientras los resultados, obtenidos con piranina, indicaron un pH citosólico de 6.95 (en presencia de K^+ y pH alcalino), el valor estimado de pH mediante el método con ácidos débiles (en este caso el par $\text{H}_2\text{CO}_3/\text{HCO}_3^-$) fue de 8.0 (Tablas 3 y 4). Esta diferencia del valor de pH, puede deberse a que los resultados obtenidos con las células electroporadas en presencia de piranina, representan valores del citosol (Peña y cols. 1995; Calahorra y cols. 1998), mientras que utilizando las concentraciones del ácido carbónico y bicarbonato, se obtiene el pH de toda la célula, incluyendo la vacuola. La vacuola es importante debido a su tamaño, que aunque es más ácida que el citosol (Calahorra, 1998) acumula también otros cationes como el K^+ , situación que podría modificar la distribución y la relación del par $\text{H}_2\text{CO}_3/\text{HCO}_3^-$ explicando las diferencias observadas.

Tal pareciera que las levaduras, además de acumular bicarbonato, en función de los valores relativos de pH, lo acumularan en los diferentes compartimentos, y la vacuola podría ser considerada como un probable reservorio para retener bicarbonato, por su tamaño y potencial de membrana inverso, positivo adentro. Esta idea es reforzada por lo informado por Calahorra y cols. (1998) donde observan un pH vacuolar de 6.0, cuando el de citosol es de 6.2 y el del medio de 4.0.

Las mediciones de pH realizadas mediante la electroporación de las células en presencia de piranina, indicaron que el pH intracelular era de 6.55 y 6.75 para glucosa a pH ácido y alcalino respectivamente, los cuales son resultados que están de acuerdo con los valores informados previamente por Preston y col. (1989); Haworth y Fliegel (1993); Höfer y col. (1996); Peña y col. (1995) y Calahorra y col. (1998). Esto nos lleva a suponer que nuestros valores se encuentran dentro del intervalo aceptable y además de que este método es suficientemente útil y preciso para medir el pH interno del citoplasma.

El efecto de los aniones sobre la acumulación de K^+

Conway y O'Malley (1946) establecieron que existía una relación estequiométrica entre el bicarbonato y la acumulación de iones K^+ , y esta característica no se mantiene para nuestras condiciones experimentales.

Ryan y cols. (1971) y Ryan y Ryan (1972), informaron que cuando los ácidos producidos por el metabolismo no pueden abandonar la célula, el transporte de K^+ aumenta y esto depende de los valores de pH interno. En las Tablas 1, 2, y 8 observamos que cuando la célula acumula aniones, la acumulación de potasio también aumenta. Por otro lado, cuando las condiciones de incubación son ácidas los valores del pH interno observados con etanol (Tabla 3) fueron más bajos que los obtenidos con glucosa. Esto se observa más claro al minuto 2.5, toda vez que el pH_i alcanza su valor más alto, para descender a los 15 min. de incubación. Ryan y Ryan (1972) observaron estimulación del transporte de potasio al medir el efecto de la presencia de ácido propiónico en el medio, y plantearon que la disminución del pH interno era capaz de estimular la entrada del catión, ya que la alcalinidad interna sería la que frenara el transporte de potasio (al limitar la actividad de la ATPasa). Sin embargo, y particularmente en nuestras condiciones de incubación a pH bajo, la explicación de Ryan y cols. (1971) y Ryan y Ryan (1972) no parece sostenerse, en vista que los valores de pH interno observados con etanol fueron inferiores a los de glucosa. Si el aumento del pH interno resultante de la acumulación de K^+ fuera el factor limitante para el transporte del mismo, debería esperarse que la entrada de K^+ fuera menor con glucosa que con etanol.

El efecto de la adición de ácido propiónico a los 10 minutos de iniciada la incubación de las células con glucosa o etanol, mostró que la acumulación del catión no cambió con glucosa, pero sí se observa un aumento cuando el sustrato es etanol (Tabla 8); Además también observamos que con glucosa como sustrato, la adición de ácido propiónico produce una disminución en la concentración de CO_2 dentro de las células (Tabla 9) Bajo estas condiciones experimentales, podemos considerar, como ácidos monoproticos, al ácido carbónico y al propiónico ya que el

pKa1 del primero es alrededor de 6.3 y el del ácido propiónico de 4.8, sugiriendo quizá que una parte del propionato sustituye al bicarbonato además de cambiar las relaciones del par bicarbonato/ác. carbónico. Esto quizás indica que la levadura pudiera utilizar distintos aniones como contraión para acumular K^+ y la alta acumulación de potasio con glucosa, diferente que con etanol, pudiera sugerir que bajo nuestras condiciones experimentales existiera una mayor producción de aniones, como por ejemplo intermediarios metabólicos tales como: los productos de la glucólisis, particularmente los fosfatos de azúcares (Peña y cols., 1969, 1972) y succinato (Conway y Brady, 1950). Además, la concentración de la forma aniónica del ácido débil dentro de la célula debe ser más baja con etanol como sustrato que con glucosa, debido al pH interno inferior que prevalece con este sustrato (Tabla 3). Un factor que podría estar involucrado, es la concentración de ATP de las células, el cual bajo nuestras condiciones experimentales se produce en menor concentración con etanol que con glucosa como sustrato (en presencia de potasio 2.0 moles/g de célula en etanol y 2.75 moles/g de célula en glucosa), esto podría influir quizá en el potencial que genera la ATPasa y a su vez en el transporte de potasio; sin embargo este es un factor difícil de valorar.

Nuestros datos apoyarían la idea de que la formación del anión $HCO_3^- + H^+$ se favorece en diferentes grados, debido al equilibrio de las reacciones de asociación/disociación de CO_2 (aq) y H_2CO_3 en solución y en función de los valores de pH interno producidos durante el metabolismo. Es posible que la acumulación de este anión en grandes cantidades pueda favorecer la acumulación de K^+ por la generación de un gradiente de concentración de una carga negativa que no difunde (Fig. 3), de acuerdo con el equilibrio de Donnan. Este fenómeno parecería ser más importante a valores bajos de pH externo, donde se tiene una gran diferencia de pH, como lo muestra la Tabla 7, y es cuando la relación de la concentración de bicarbonato interno y externo alcanza un valor más alto. Lo que nos permite sugerir que se forma un potencial Donnan por la acumulación pasiva de un anión que no difunde (bicarbonato), sea posiblemente el mecanismo de acumulación de potasio, medio por el cual la levadura pueda indirectamente utilizar el gradiente de pH sin la necesidad de un simporte H^+/K^+ como el encontrado en *Neurospora* (Rodríguez-Navarro y cols., 1986). Esta explicación pudiera aclarar el aumento en la acumulación de K^+ al incubar las células con etanol como sustrato y agregar ácido propiónico en el medio, ya que se estaría favoreciendo la generación del potencial Donnan con la acumulación de aniones propionato, producidos por la disociación del ácido propiónico (cuyo pKa es 4.8) a las condiciones de pH intracelular prevalecientes en nuestras condiciones (alrededor de 6.0) además de su posible transporte al interior (Tabla 10).

El apoyo experimental para esta propuesta, se fundamenta en los datos obtenidos por la estimación del potencial de membrana de las células y los cambios producidos por la adición de ácido propiónico para ambos sustratos, glucosa y etanol. De hecho, al agregar ácido propiónico al medio cuando el sustrato es etanol, se manifiesta un aumento significativo de la fluorescencia de la cianina DiSC3(3) que se utilizó para medir el potencial de la membrana (Peña y cols., 1984) el cual no se observó cuando el sustrato era glucosa. Aunque podría argüirse que la entrada del ácido propiónico es semejante con etanol y glucosa como sustratos (Tabla 10), debe tomarse en cuenta que con glucosa, la adición del propiónico produjo una disminución del CO_2 (Tabla 9), parte del cual podría intercambiarse con los aniones propionato y/o cambiar la relación del par HCO_3^-/H_2CO_3 . Además cuando medimos los valores de pH (externo e interno) al momento de

agregar el ácido propiónico, observamos que la diferencia de pH, en las cuatro condiciones experimentales (datos no mostrados), fueron parecidas, lo que nos indicaría que el transporte de potasio (efectuado por cualquiera de los transportadores) se realiza como consecuencia del aumento en el potencial de membrana.

Los datos obtenidos del consumo de oxígeno en ambos sustratos, bajo diferentes condiciones experimentales, descartan la posibilidad que el efecto observado por la presencia del ácido se debiera a una contribución como fuente de energía o estimulación sobre la ATPasa mitocondrial, ya que con etanol como sustrato la velocidad de consumo de oxígeno disminuyó con 10 mM de propiónico; ésto es, se inhibió la respiración (datos no mostrados). Estos datos reforzarían la idea de que el aumento en el potencial de membrana, bajo nuestras condiciones experimentales, se debe a la importante contribución del potencial Donnan generado por las cargas negativas que se acumulan, sin negar que la H^+ -ATPasa se acepta como la principal generadora del $\Delta\Psi$ en las células de levadura (aún cuando está en debate el grado de electrogenicidad) en analogía con lo establecido en *Neurospora crassa* (Slayman y cols., 1973)

También se consideró la posibilidad que el aumento del potencial de membrana plasmática, se debiera a un efecto de estimulación directa, de los aniones bicarbonato o propionato, sobre la ATPasa de la membrana plasmática; semejante a otras reportadas, como ejemplo, ATPasa de eritrocitos (Itzusu, 1997), ATPasa mitocondrial de pera (Malhotra, 1974) y de hígado de ratas (Ebel, 1975) así como V-ATPasa (Kibac, 1993). Sin embargo nuestros resultados (datos no mostrados) indicaron que no había estimulación sobre la ATPasa, cuando trabajamos con membranas plasmáticas de levadura; datos que concuerdan con lo informado por Delhez (1977) para ATPasa de membrana plasmática de *Schizosaccharomyces pombe*.

La regulación del pH interno de la levadura.

El principal mecanismo por el cual la levadura se deshace de los protones, consiste en su expulsión, acidificando del medio (Tabla 6), por medio de la H^+ -ATPasa que ayuda a retener una gran cantidad de HCO_3^- en su interior (Tabla 5). Estos datos podrían llevarnos a la discusión del papel regulador de la H^+ -ATPasa de la membrana plasmática sobre el pH interno de la célula. Se ha considerado que esta enzima es la que expulsa una parte importante de los protones derivados del metabolismo (Serrano, 1980), podría pensarse que regula el pH interno, como lo sugerían Sanders y cols. (1981) y Sanders y Slayman (1982), sin embargo, parece tratarse más bien de una capacidad de la enzima simplemente para bombear más protones mientras más hay, pero no a un papel regulador propiamente dicho, ya que existen evidencias fisiológicas de que el pH interno y externo son factores que regulan la actividad de la ATPasa de levaduras (Riemersma y Alsbach, 1974; Serrano, 1980).

De hecho, el bombeo de protones por parte de la ATPasa da lugar a que el pH interno no se acidifique. En presencia de glucosa, por la producción de CO_2 y el ácido carbónico derivado de su hidratación, se esperarían valores de pH interno mucho más bajos que cuando el sustrato es etanol, sin embargo el pH intracelular es más alto (Tabla 3). De esta manera, el bombeo de protones por la H^+ -ATPasa de la membrana plasmática, en especial a valores altos del pH

externo, o aún a pHs bajos en presencia de K^+ , da lugar a una alcalinización del citoplasma, pues el resultado neto es la acumulación de bicarbonato (Tabla 5), también como lo sugieren los resultados de Peña y cols., 1969, 1972 y Peña, 1975. Entonces la ATPasa juega un papel fundamental como responsable de valores de pH altos, pero no podría decirse que regulara el pH citosólico.

La regulación del pH interno al final requiere de un mecanismo que evite una exagerada alcalinización en presencia de glucosa, tanto a un pH alto del medio, como en presencia de K^+ . Al respecto, Ramírez y cols. (1998) han propuesto la existencia de un intercambiador H^+/K^+ que tendría entonces la función de expulsar al catión monovalente a cambio de protones y evitar la alcalinización exagerada del citoplasma.

Otro dato importante encontrado, consiste en que no encontramos actividad de anhidrasa carbónica. Esta información no existe en la literatura, y no deja de llamar la atención que un organismo como la levadura, que maneja cantidades enormes de CO_2 , no cuente con un sistema rápido para hidratar o deshidratarlo.

CONCLUSIONES

La concentración de aniones de ácidos débiles producidos por el metabolismo, parece estimular la acumulación de potasio por la célula, por la generación de un gradiente de potencial (negativo en el interior), de acuerdo con un equilibrio de Donnan, que representa un factor importante para la acumulación del K^+ , particularmente a pH externo bajo. Los aniones de ácidos débiles provocan un aumento de potencial a través de la membrana, puesto de manifiesto con pruebas con el indicador fluorescente.

Este mecanismo de acumulación de K^+ puede utilizar diferentes aniones, pero cuantitativamente tal vez el HCO_3^- sea el más importante.

El potencial generado a través de la membrana, no es producto de la estimulación de los aniones sobre la ATPasa de membrana plasmática.

La disminución del pH interno que provoca la carga ácida, no parece ser el mecanismo que dirige el transporte de potasio al interior, ya que células incubadas con etanol como fuente de energía tiene un pH interno más bajo que las crecidas con glucosa, y el contenido de potasio es menor en el primero que con el segundo.

Hay un papel de la H^+ -ATPasa de la membrana plasmática que aunque difícilmente se puede considerar como regulador del pH interno de la célula, le permite a ésta, no sólo mantener el pH interno en valores mayores que lo que sería de esperar por la gran producción de CO_2 , que se hidrata a ácido carbónico, sino que el medio interno en presencia de glucosa, que debería ser mucho más bajo, sea en realidad más alto.

BIBLIOGRAFIA

- Alijo, R. and Ramos, J. (1993) Several routes of activation of the potassium uptake system of yeast. *Biochim. Biophys. Acta* 1179:224-228.
- Aono, O. and Ohki, S. (1972) Origin of resting potential of axon membrane. *J. Theor. Biol.* 37:273- 282.
- Armstrong, W, McD. and Rothstein, A., (1964) Discrimination between alkali metal cations by yeast. I. Effect of pH on uptake *J. Gen. Physiol.* 48:61-71.
- Armstrong, W, McD. and Rothstein, A., (1967) Discrimination between alkali metal cations by yeast. II. Cation interactions in transport. *J. Gen. Physiol.* 50:967- 988.
- Baggot, J. (1997) Gas transport and pH regulation. En "Textbook of Biochemistry" (Thomas M. Devlin, ed). 3^a ed.p 1025-1058 Jonh Wiley & Sons Inc..
- Bakker, R., Dobbelmann, J. and Borst-Pauwels, G.W.F.H. (1986) Membrane potential in the yeast *Endomyces magnusii* mesured by microelectrodes and TPP⁺ distribution. *Biochim. Biophys. Acta* 861:205-209.
- Ballarin-Denti, A. Slayman, C.L. and Kuroda, H. (1994) Small lipid-soluble cations are not membrane voltage probes for *Neurospora* or *Saccharomyces*. *Biochim. Biophys. Acta* 1190:43-56.
- Benito, B., Portillo, F. And Lagunas, R. (1992) In vivo activation of the yeast plasma membrane ATPase during nitrogen starvation. Identification of the regulatory domain that controls activation. *FEBS Lett.* 300:271-274.
- Bertl, A., Anderson, J.A., Slayman, C.L. and Gaber, R.F. (1995) Use of *Saccharomyces cerevisiae* for patch-clamp analysis of heterologous membrane proteins: Characterization of KAT1, an inward-rectifying K⁺ channels and carriers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:2701-2705.
- Blatt, M.R., Rodriguez-Navarro, A. and Slayman, C.L. (1987) Potassium-proton symport in *Neurospora*: Kinetic control by pH and membrane potential. *J. Membr. Biol.* 98:169-189.
- Blatt, M.R. and Slayman, C.L. (1987) Role of "active" potassium transport in the regulation of cytoplasmic pH by nonanimal cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 84:2737-2741.
- Borst-Pauwels, G.W.F.H., Schnetkamp, P. and Van Weell, P., (1973) Activation of Rb⁺ and Na⁺

- uptake into yeast by monovalent cations. *Biochim. Biophys. Acta* 291:274-279.
- Borst-Pauwels, G.W.F.H., Wolters, G.H.J., and Henricks, J.J.G. (1971) The interaction of 2,4-dinitrophenol with anaerobic ^{86}Rb transport across the yeast cell membrane. *Biochim. Biophys. Acta* 225:269-276.
- Borst-Pauwels, G.W.F.H. (1981) Ion transport in yeast. *Biochim. Biophys. Acta* 650:88-127.
- Boxman, A.W., Dobbelmann, J. and Borst-Pauwels, G.W.F.H. (1984) Possible energization of K^+ accumulation into metabolizing yeast by the protonmotive force. Binding correction to be applied in the calculation of the yeast membrane potential from tetraphenylphosphonium distribution. *Biochim. Biophys. Acta* 772:51-57.
- 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.* 217:30-36.
- Calahorra, M., Ramírez, 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.
- Calahorra, M., Martínez, Gl. A. , Hernández-Cruz, A., and Antonio Peña. (1998) Values of yeast cytoplasmic and vacuolar pH, the influence of monovalent cations. *Yeast* 14:501-515.
- Camarasa, C., Prieto, S., Ros, R., Salmon, J., and Barre, P. (1996) Evidence for a selective and electroneutral K^+/H^+ -exchange in *Saccharomyces cerevisiae* using plasma membrane vesicles. *Yeast* 12:1301-1313.
- Carmelo, V., Santos, H. and Sá-Correia, I. (1997) Effect of extracellular acidification on the activity of plasma membrane ATPase and on the cytosolic and vacuolar pH of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim. Biophys. Acta* 1325:63-70.
- Cartwright, C.P., Veazey, F.J. and Rose, A.H. (1987) Effect of ethanol on activity of the plasma membrane ATPase in, and accumulation of glycine by *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Gen. Microbiol.* 133:857-865.
- Cerbón, J. and Calderón, V. (1990) Proton-linked transport systems as sensors of change in the membrane surface potential. *Biochim. Biophys. Acta* 1028:261-267.
- Cerbón, J. and Calderón, V. (1994) Surface potential regulation of phospholipid composition and in-out translocation in yeast. *Eur. J. Biochem.* 219:195-200.
- Chapell, J.B. (1963) The effect of alkylguanidines on mitochondrial metabolism. *J. Biol. Chem.* 238:410-417.
- Cimprich, P., Slavík, J., and Kotyk, A. (1995) Distribution of individual cytoplasmic pH values in a population of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol.Lett.* 130:245-252.

Conway, E.J. and MacDonnell, E. (1945) Carboxylase and carbonic acid. *Nature, Lond.* 156:752-753.

Conway, E.J. and Brady, T.G. Biological production of acid and alkali. (1950) I. Quantitative relations of succinic and carbonic acids to the potassium and hydrogen ion exchange in fermenting yeast. *Biochem. J.* 47:360-369.

Conway, E.J., Brady, T.G., and Carton, E. (1950) Biological production of acid and alkali. II. A redox theory for the process in yeast with application to the production of gastric acidity. *Biochem. J.* 47:369-374.

Conway, E.J. and Downey, M. (1950). pH values of the yeast cell. *Biochem. J.* 47:355-360.

Conway, E.J. and O'Malley, E. (1946) The nature of the cation exchanges during yeast fermentation, with formation of 0.02N-H ion. *Biochem. J.* 40:59-67.

Conway, E.J. and Duggan, F. (1958) A cation carrier in the yeast cell wall. *Biochem. J.* 69:265-274

Cooper, T.G. Tchen, T.T., Wood H.G. and Benedict, C. R. (1968) The carboxylation of phosphoenolpyruvate and pyruvate. I. The active species of CO₂ utilized by phosphoenolpyruvate carboxykinase, carboxytransphosphoylase, and pyruvate carboxylase. *J. Biol. Chem.* 243:3857-3863.

De la Peña, P. Barros, F., Gascón, S., Lazo, P.S. and Ramos, S (1981) Effect of yeast killer toxin on sensitive cell of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 256:10420-10425.

De la Peña, P. Barros, F., Gascón, S., Ramos, S. and Lazo, P.S. (1982) The electrochemical proton gradient of *Saccharomyces*. The role of potassium. *Eur. J. Biochem.* 123:447-453.

Delhez, J., Dufour, J.P., Thines, D. and Goffeau, A. (1977) Comparison of the properties of plasma membrane-bound and mitochondria-bound ATPases in the yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Eur. J. Biochem.* 79:319-328.

Deamer, D.W., Prince, R.C. and Crofts, A.R. (1972) The response of fluorescent amines to pH gradients across liposome membranes. *Biochim. Biophys. Acta* 274:323-335.

Derks, W.J.G. and Borst-Pauwels, G.W.F.H. (1980) Interaction of monovalent cations with Rb⁺ and Na⁺ uptake in yeast. *Biochim. Biophys. Acta* 596:381-392.

Den Hollander, J.A., Ugurbil, K., Brown, T.R. and Shulman, R.G. (1981) Phosphorous-31 nuclear magnetic resonance studies of the effect of oxygen upon glycolysis in yeast. *Biochemistry* 20:5871-5880.

- Ebel, R.E. and Lardy, H.A. (1975) Stimulation of rat liver mitochondrial adenosine triphosphatase by anions. *J. Biol. Chem.* 250:191-196.
- Eddy, A.A., Inoge, K.J., Backen, K. and Nowacki, J.A. (1970) Interaction between potassium ions and glycine transport in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem. J.* 120:845-852.
- Eraso, P. and Gancedo, C. (1987) Activation of yeast plasma membrane ATPase by acid pH during growth. *FEBS Lett.* 224:187-192.
- Eraso, P., Mazón, M.J. and Gancedo, J.M. (1987) Internal acidification and cAMP increase are not correlated in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur. J. Biochem.* 165:671-674.
- Faust, A.S., Wenzel, L.A., Clump, C.W., Maus, L. and Andersen, L.B. (1982) Operaciones con transferencia de masa en "Principios de operaciones unitarias" cap. 2: 25-34 Ed. continental.
- Fiske, C.A. and Subbarow, Y. (1925). The colorimetric determination of phosphorous. *J. Biol. Chem.* 177:751-766.
- Funayama, S., Gancedo, J.M., and Gancedo, C. (1980) Turnover of yeast Fructose-bisphosphatase in different metabolic conditions. *Eur. J. Biochem.* 109:61-66.
- Gaber, R.F., Styles, C.A. and Fink, G.R. (1988) TRK1 encodes a plasma membrane protein required for high-affinity potassium transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 8:2848-2859.
- Gillies, R.J., Ugurbil, K., Den Hollander, J.A. and Shulman, R.G. (1981) ^{31}P NMR studies of intracellular pH and phosphate metabolism during cell division cycle of *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 78:2125-2129.
- Gustin, M.C., Martinac, B., Saimi, Y., Culbertson, M.R. and Kung, C. (1986) Ion channels in yeast. *Science* 233:1195-1197.
- Gustin, M.C., Zhou, X., Martinac, B. and Kung, C. (1988) A mechanosensitive ion channel in the yeast plasma membrane. *Science* 242:762-765.
- Hauer, R. and Höfer, M., (1978) Evidence for interactions between the energy-dependent transport of sugars and the membrane potential in the yeast *Rhodotorula gracilis* (*Rhodospiridium toruloides*) *J. Membrane Biol.* 43:335-349.
- Hauer, R., Uhlemann, G., Neumann, J. and Höfer, M., (1981) Proton pumps of the plasmalemma of the yeast *Rhodotorula gracilis* their coupling to fluxes of potassium and other ions. *Biochim. Biophys. Acta.* 649:680-690.
- Haworth, R.S. and Fliegel, L. (1993) Intracellular pH in *Schizosaccharomyces pombe* comparison with *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biochem.* 124:131-140.

- Hille, B. (1971) The permeability of the sodium channel to organic cations in myelinated nerve. *J. Gen. Physiol.* 58:599-619
- Höfer, M., Nicolay, K. and Robillard Georges. (1985) The electrochemical H^+ gradient in the yeast *Rhodotorula glutinis*. *J. Bioenerg. Biomemb.* 17:175-182.
- Höfer, M., Calahorra, M., and Peña, A. (1996) Assesment of $\Delta\mu_H^+$ in *Schizosaccharomyces pombe*; intracellular inclusion of impermeable agents by electroporation. *Folia Microbiol.* 41:98-100.
- Hunter, M.J. (1977) Human erythrocyte anion permeabilities measured under conditions of net charge transfer. *J. Physiol.* 268:35-49.
- Imai, T. and Ohno, T. (1995) Measurement of yeast intracellular pH by image processing and the change it undergoes during growth phase. *J. Biotechnol.* 38:165-172.
- Izutsu, K.T., Madden, P.R., Watson, E.L. and Siegel, I.A. (1977) Propierties of the HCO_3^- stimulates Mg^{2+} -ATPase activity in red cell membranes. *Eur. J. Physiol.* 369:119-124.
- Jones, R.P. and Greenfield, P.F. (1982) Effect of carbon dioxide on yeast growth and fermentation. *Enzyme Microb. Technol.* 4:210-223.
- Junge, W. (1977) Membrane potentials in photosynthesis. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 28:503-536.
- Kano, K. and Fendler, J. H. (1978) Pyranine as a sensitive probe for liposome interiors and surfaces. pH gradients across phospholipid vesicles. *Biochim. Biophys. Acta* 509:289-299.
- Keilin, D. and Mann, T. (1940). Carbonic anhidrase (plant and animal) En "Methods in Enzymology" (1955) (S.P Colowick and N.O. Kaplan, eds) vol. II. p. 836-840 Academic Press. New York.
- Kibak, H., Van Eeckhout, D., Cutler, T., Taiz, S.L. and Taiz, L. (1993) Sulfite both stimulates and inhibits the yeast vacuolar H^+ - ATPase. *J. Biol. Chem.* 268:23325-23333.
- Ko, C.H., Buckley, A.M., and Gaber, R.F. (1990) TRK2 is required for low affinity K^+ transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 125:305-312.
- Krebs, H.A. and Roughton, F.J.W. (1948) Carbonic anhydrase as a tool in studying the mechanism of reactions involving H_2CO_3 , CO_2 or HCO_3^- *Biochem. J.* 43:550-555.
- Malhotra, S.S. and Spencer, M. (1974) Effects of ethylene, carbon dioxide, and ethylene-carbon dioxyde mMixtures on the activities of "membrane-containing" and "highly purified" preparations of adenosine triphosphstase from pea-cotyledon mitochondrial. *Can. J. Biochem.* 52:1091-1096.

MacDonald, R.C. and Bangham, A.D. (1972) Comparison of double layer potentials in lipid monolayers and lipid bilayer membranes. *J. Membr. Biol.* 7:29-35.

Malapartida, F. and Serrano, R. (1981) Reconstitution of the proton-translocating adenosine triphosphatase of yeast plasma membranes. *J. Biol. Chem.* 256:4175-4177.

Mitchell, P. (1961) Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemiosmotic type of mechanism. *Nature* 191:144-148.

Mitchell, P. (1968) Chemiosmotic coupling and energy transduction. Bodmin, Cornwall: Glynn Research Ltd.

Misra, P. y Hofer, M. (1975) An energy-linked proton-extrusion across the cell membrane *Rhodotorula gracilis*. *FEBS Lett.* 52:95-99.

Ohki, S. (1981) Membrane potential, Surface potential, and ionic permeabilities. *Physiol. Chem. & Physics.* 13:195-210.

Ohki, S. (1971) Electrical potential of an asymmetric membrane. *J. Colloid Interface Sci.* 37:318-324.

Ohki, O. (1972) Membrane potential of phospholipid bilayers: Ion concentration and pH difference. *Biochim. Biophys. Acta* 282:55-71

Peña, A. (1973) Studies with guanidines on the mechanism of K⁺ transport in yeast. *FEBS Lett.* 34:117-119.

Peña, A. (1975) Studies on the mechanism of K⁺ transport in yeast. *Arch. Biochem. Biophys.* 167:397-407.

Peña, A., Carrasco, N. and Mora, M.A. (1979) Uptake and effects of several cationic dyes on yeast. *J. Membr. Biol.* 47: 262-284.

Peña, A., Cinco, G., García, A., Gómez-Puyou, A. and Tuena, M. (1967). Effects of externally added sodium and potassium ions on the glycolytic sequence of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim. Biophys. Acta* 148:673-682.

Peña, A., Cinco, G., Gómez-Puyou, A., and Tuena, M. (1969) Studies on the mechanism of stimulation of glycolysis and respiration by K⁺ in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim. Biophys. Acta* 180:1-8.

Peña, A., Cinco, G., Gómez-Puyou, A., and Tuena, M. (1972) Effects of the pH of the incubation medium on glycolysis and respiration in *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch. Biochem. Biophys.* 153:413-425.

- Peña, A. and Ramírez, G. (1975) Interaction of Ethidium bromide with the transport system for monovalent cations in yeast. *J. Membrane Biol.* 22:369-384.
- Peña, A. and Ramírez, J. (1991) An energy-dependent efflux system for potassium ions in yeast. *Biochim. Biophys. Acta.* 1068:237-244.
- Peña, A., Ramírez, J., Rosas, G., and Calahorra, M. (1995) Proton pumping and the internal pH of yeast cells, measured with pyranine introduced by electroporation. *J. Bacteriol.* 177:1017-1022.
- Peña, A., Uribe, S., Pardo, J.P., and Borbolla, M. (1984) The use of cyanine dye in measuring membrane potential in yeast. *Arch. Biochem. Biophys.* 231:217-225.
- Pressman, B.C. (1963) The effect of guanidine and alkylguanidines on the energy transfer reactions of mitochondria. *J. Biol. Chem.* 238:401-409.
- Preston, R. A., Murphy, R. F., y Jones, E. W. (1989) Assay of vacuolar pH in yeast and identification of acidification-defective mutants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:7027-7031.
- Ramírez, J., Peña, A. and Montero-Lomelí, M. (1996) H^+/K^+ exchange in reconstituted yeast plasma membrane vesicles. *Biochim. Biophys. Acta* 1285:175-182.
- Ramírez, J., Ramírez, O., Saldaña, C., Coria, R. , Peña A. (1998) A *Saccharomyces cerevisiae* mutant lacking a K^+/H^+ exchanger. *J. Bacteriol* 180:5860-5865.
- Ramos, J., Contreras, P. and Rodríguez-Navarro, A. (1985) A potassium transport mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch. Microbiol.* 143:88-93.
- Ramos, S., Balbín, M., Raposo, M., Valle, E. And Pardo, L.A. (1989) The mechanism of intracellular acidification induced by glucose in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Gen. Microbiol.* 135:2413-2422.
- Ramos, J., Haro, R. and Rodríguez-Navarro, A. (1990) Regulation of potassium fluxes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim. Biophys. Acta* 1029:211-217.
- Ramos, J., Haro, R., Alijo, R. and Rodríguez-Navarro, A. (1992) Activation of the potassium uptake system during fermentation in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* 174:2025-2027.
- Ramos, J. and Rodríguez-Navarro, A. (1986) Regulation and interconversion of the potassium transport system of *Saccharomyces cerevisiae* as revealed by rubidium transport. *Eur. J. Biochem.* 154:307-311.
- Riemersma, J.C., and Alsbach, E.J.J. (1974) Proton translocation during anaerobic energy production in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim. Biophys. Acta* 339:274-284.

- Riemersma, J.C. (1968) Effects of sodium azide and 2,4-dinitrophenol on phosphorylation reactions and ion fluxes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim. Biophys. Acta* 153:80-87.
- Rodríguez-Navarro, A., Blatt, M.R. and Slayman, C.L. (1986) A potassium-proton symport in *Neurospora crassa*. *J. Gen Physiol.* 87:649-674.
- Rodríguez-Navarro, A. and Ramos, J. (1984) Dual system for potassium transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* 159:940-945.
- Rodríguez-Navarro, A. and Ramos, J. (1986) Two system mediate rubidium uptake in *Neurospora crassa*: one exhibits the dual-uptake isotherm. *Biochim. Biophys. Acta* 857:229-237.
- Roos, A. and Boron, W.F. (1981) Intracellular pH. *Physiol. Rev.* 61:296-434.
- Rosa, M.F. and Sá-Correia, I. (1991) In vivo activation by ethanol of plasma membrane ATPase of *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Environ. Microbiol.* 57:830-835.
- Rothstein, A. and Bruce, M. (1958) The efflux of potassium from yeast cells into a potassium free medium. *J. Cell. Comp. Physiol.* 51:439-455.
- Rothstein, A. and Demis, C. (1953) The relationship of the cell surface to metabolism. The stimulation of fermentation by extracellular potassium. *Arch. Biochem. Biophys.* 44:18-29.
- Ryan, H., Ryan, J.P., and O'Connor, W.H. (1971) The effect of diffusible acids on potassium ions uptake by yeast. *Biochem. J.* 125:1081-1085.
- Ryan, J.P. and Ryan, H. (1972) The role of intracellular pH in the regulation of cation exchanges in yeast. *Biochem. J.* 128:139-146.
- Sanders, D., Hansen, U.P., and Slayman, C.L. (1981) Role of the plasma membrane proton pump in pH regulation in non-animal cell. *Proc. Natl. Sci. USA* 78:5903-5907.
- Sanders, D. and Slayman, C.L. (1982) Control of intracellular pH. Predominant role of oxidative metabolism, not proton transport, in the eukaryotic microorganism *Neurospora*. *J. Gen. Physiol.* 80:377-402.
- Salhany, J.M., Yamane, T., Shulman, R.G. and Ogawa, S. (1975) High resolution ^{31}P nuclear magnetic resonance studies of intact yeast cells. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 72:4966-4970.
- Serrano, R. (1980) Effect of ATPase inhibitors on the proton pump of respiratory-deficient yeast. *Eur. J. Biochem.* 105:419-424.
- Serrano, R. (1983) In vivo glucose activation of the yeast plasma membrane ATPase. *FEBS Lett.* 156:11-14.

Serrano, R., Kielland-Brandt, M.C. and Fink, G.R. (1986) Yeast plasma membrane ATPase is essential for growth and has homology with (Na⁺ + K⁺), K⁺- and Ca⁺-ATPases. *Nature* 319:689-693.

Shoaf III, W.T. and Jones M.E. (1970) Carbonic anhydrase of microorganisms: I. An enzyme from baker's yeast which catalyzes the formation of carbamate from ammonium bicarbonate solutions. *Arch. Biochem. Biophys.* 139:130-142.

Simon, S.A. and Gutknecht, J. (1980) Solubility of carbon dioxide in lipid bilayer membranes and organic solvents. *Biochim. Biophys. Acta.* 596:352-358.

Slavík, J. (1982) Intracellular pH of yeast cells measured with fluorescent probes. *FEBS Lett.* 140:22-26.

Slavík, J. and Kotyk, A. (1984) Intracellular pH distribution and transmembrane pH profile of yeast cells. *Biochim. Biophys. Acta.* 766:679-684.

Slayman, C.L. (1965) Electrical properties of *Neurospora crassa* respiration and the intracellular potential. *J.Gen. Physiol.* 49:93-116.

Slayman, C.W., Long, W.S. and Lu, C.H. (1973) The relationship between ATP and electrogenic pump in the plasma membrane of *Neurospora crassa*. *J. Membr. Biol.* 14:305-338.

Slayman, C.L., Moussatos, V.V. and Webb, W.W. (1994) Endosomal localization of fluorescent indicators: Vacuolar sequestration of AM dyes in *Neurospora crassa* and in cultured mammalian fibroblasts. *Biophys. J.* 66:A275.

Slayman, W.C. and Slayman, C.L. (1970). Potassium transport in *Neurospora crassa* : Evidence for a multisite carrier at high pH. *J.Gen. Physiol.* 55:758-786.

Stretton, S. and Goodman A.E. (1998) Carbon dioxide as a regulator of gene expression in microorganisms. *Antonie-Van-Leeuwenhoek.* 73:79-85

Ulaszewski, S., Grenson, M. and Goffeau, A. (1983) Modified plasma-membrane ATPase in mutants of *Saccharomyces cerevisia*. *Eur. J. Biochem.* 130:235-239.

Vacata, V., Kotyk, A. and Sigler, K. (1981) Membrane potential in yeast cell measured by direct and indirect methods. *Biochim. Biophys. Acta* 643:265-268.

Van de Mortel, J.B.J., Mulders, D., Korthout, H., and Theuvenet, A.P.R. (1988) Transient hyperpolarization of yeast by glucose and ethanol. *Biochim. Biophys. Acta* 936:421-428.

Van de Mortel, J.B.J., Theuvenet, A.P.R. and Borst-Pauwels, G.W.F.H. (1990) A putative K⁺-selective channel in the plasma membrane of yeast that is blocked by micromolar concentrations

of external divalent cation and is insensitive to tetra ethylammonium. *Biochim. Biophys. Acta* 1026:220-224.

Villalobo, A., Boutry, M. and Goffeau, A. (1981) Electrogenic proton translocation coupled to ATP hydrolysis by the plasma membrane Mg^{2+} -dependent ATPase of yeast in reconstituted proteoliposomes. *J. Biol. Chem.* 256:12081-12087.

Waggoner, A.S. (1979) Dye indicators of membrane potential. *Ann. Rev. Biophys. Bioeng.* 8:47-68.

Warncke, J. and Slayman, C.L. (1980) Metabolic modulation of stoichiometry in a proton pump. *Biochim. Biophys. Acta* 591:224-233.

APENDICE

**ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

Effects of Weak Acids on Cation Accumulation, ΔpH and $\Delta\Psi$ in Yeast

RUTH LÓPEZ¹, EMANUEL ENRÍQUEZ¹ AND ANTONIO PEÑA^{1*}

Departamento de Genética y Biología Molecular, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado 70-600, 04510 México DF, México

With glucose as carbon source, as reported by other authors (Conway *et al.*, 1950), yeast cells accumulated large amounts of CO_2 , carbonic acid, bicarbonate and K^+ than when grown with ethanol. The addition of propionic acid to the cells produced an increase in the potassium ion accumulation when cells were incubated with ethanol as substrate, but not when incubated with glucose. In disagreement with Ryan *et al.* (1971) and Ryan and Ryan (1972), the internal pH of the cells with ethanol was lower than with glucose, eliminating this factor as the limiting factor for potassium accumulation. When the membrane potential difference was estimated, it was found that it was higher with glucose as substrate than with ethanol. In addition, with ethanol the addition of propionic acid produced an increase of the membrane potential, in agreement with the idea of an accumulation of the anions of monoprotic acids, which, being not diffusible, increase the negative membrane potential inside, which can drive the accumulation of larger amounts of monovalent cations. It was also found that the addition of propionic acid to cells incubated with glucose as substrate produced an efflux of CO_2 from the cells, so that an exchange of the acid appears to take place. Copyright © 1999 John Wiley & Sons, Ltd.

KEY WORDS — yeast; bicarbonate; potassium accumulation; Donnan potential

INTRODUCTION

In *Neurospora crassa*, Rodríguez-Navarro *et al.* (1986) showed that the pH gradient can be used to drive potassium ions into the cell by means of a H^+/K^+ symporter, which allows the cell to use this gradient as an additional driving force to accumulate K^+ (see also Blatt *et al.*, 1987). Although in yeast this symporter has been impossible to find, it appears possible that yeast cells also have a way of using the pH gradient for the same purpose, especially because they can generate it to a much larger extent than *Neurospora*. In fact, it has been known for a long time (Conway and O'Malley, 1946) that yeast cells can produce very low values of the external medium pH; starved cells show

values of the internal pH between 5.7 and 5.9, which in the presence of a substrate and K^+ can reach values close to 7.0. This change of the pH of the medium, which is larger when the starting pH is high, is produced both by the activity of the H^+ -ATPase of the plasma membrane (Peña, 1975; Goffeau and Slayman, 1981) and the production of large amounts of CO_2 , which can be hydrated to $\text{H}_2(\text{O})_3$. Then the latter ionizes into HCO_3^- and H^+ , and hydrogen ions are pumped out by the ATPase, resulting in the accumulation of bicarbonate. It has also been found that the accumulation of carbonic acid and bicarbonate increases by the presence of K^+ (Conway *et al.*, 1950).

Ryan *et al.* (1971) reported that the addition of organic acids, acetate or propionate or the bubbling of CO_2 increases the accumulation of K^+ with ethanol as substrate. This phenomenon was reproduced by Peña (1975). These results were explained by Ryan and Ryan (1972) as a result of the compensation of the alkalization produced by the transport of K^+ resulting from the increased proton pumping by the cells observed in the presence of the cation. It was suggested that the

*Correspondence to: A. Peña, Departamento de Genética y Biología Molecular, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado 70-600, 04510 México DF, México. E-mail: apc@fisiol.unam.mx.

Contract/grant sponsor: Dirección General de Asuntos del Personal Académico, Universidad Nacional Autónoma de México; Contract/grant numbers: IN-202193, IN-207696.

Contract/grant sponsor: Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, México; Contract/grant number: 3188N-N9307.

increase of the internal pH resulting from the transport of K^+ could be a limiting factor for its accumulation (Ryan *et al.*, 1971; Ryan and Ryan, 1972).

Yeast cells have to handle up to around 200 mM amounts of CO_2 and H_2CO_3 and H^+ deriving from its ionization, which represent an interesting problem from the point of view of the regulation of the internal pH of the cell. In fact, at equilibrium, the internal HCO_3^-/H_2CO_3 changes between 0.25:1 and 6:1 for external pH values between 4.0 and 7.0, resulting in internal pH values between 5.7 and 7.0. CO_2 production occurs as such in decarboxylation reactions (Krebs and Roughton, 1948; Cooper *et al.*, 1968); it is hydrated with a negligible activity of carbonic anhydrase, and part of it is dissolved.

This work represents an attempt to explain the role of weak acids, but mainly carbonic acid, in the accumulation of monovalent cations and some of the factors involved in the regulation of the internal pH of the cells.

MATERIALS AND METHODS

Yeast and growth conditions

Yeast *Saccharomyces cerevisiae*, isolated as a single colony from a commercial product (La Azteca, S.A) was used for this work. Cells were grown in 500 ml of YPD medium (1% yeast extract, 2% peptone and 2% glucose) for 24 h in a gyrotory shaker at 250 rpm in a room at a controlled temperature of 30°C. They were collected and washed twice with distilled water by centrifugation. The resulting pellet was resuspended in distilled water (10%, w/w) and aerated by incubation in the same gyrotory shaker for 14 h. Then they were collected again, washed twice by centrifugation and resuspended in water to a ratio of 0.5 g/ml, and kept on ice until used during the course of the same day.

Ion accumulation experiments

100 mg of cells were incubated in 5 ml of a medium containing 100 mM glucose without shaking, or 8.6 mM ethanol, shaking for 15 min in a 25 ml Erlenmeyer flask in a water bath at 30°C. 30 mM KCl was added when indicated. The media were buffered with 10 mM triethanolamine (TEA) adjusted to pH 7.5 with tartaric acid, or tartaric acid adjusted with TEA to pH 4.5. After incubation the suspension was centrifuged and the

supernatant and/or the pellet were used for the measurement of the different metabolites. When indicated, 10 mM propionic acid, adjusted to the external pH, were added.

CO₂ measurements

After incubation and centrifugation, 2 ml of 1% NaOH were added both to the supernatant and the cell pellet to fix CO_2 in all its forms. The content of CO_2 was measured using the Warburg respirometer, adding after temperature equilibration 0.5 ml of 2 N H_2SO_4 to liberate all the CO_2 .

Measurement of potassium content

After centrifugation, the cells were resuspended in distilled deionized water and were placed in a boiling bath for 30 min. After cooling, the suspension was centrifuged and appropriate dilutions of the supernatant were used for the measurement of K^+ in a flame photometer.

Distribution of radioactive propionic acid

Its entrance was measured using $^{14}CH_3-CH_2-COOH$. After incubating the cells under the already mentioned conditions for 10 min, the indicated concentrations of propionic acid were added, and after 10 more min, an aliquot of the suspension was taken, filtered through a millipore filter (0.45 μm mean pore size) and the radioactivity was measured in a scintillation counter.

Estimation of the membrane potential

Membrane potential was estimated by following the fluorescence changes of 0.25 μM of the cyanine DiSC₃(3) (dithiacarbocyanine, Molecular Probes) at 540–590 nm (Peña *et al.*, 1984) in a DMX-1000 spectrofluorometer (SLM Instruments) with a cell compartment controlled at 30°C and an acquisition and processing system. 25 mg of cells were incubated in 2.0 ml of the following medium: 100 mM glucose or 8.6 mM ethanol; 10 mM triethanolamine adjusted to pH 7.5 with tartaric acid, or 10 mM tartaric acid adjusted to pH 4.5 with triethanolamine; 10 μM pentachlorophenol, 10 μM $CaCl_2$.

Measurement of the internal pH

The internal pH of the cells was determined by measuring the fluorescence changes of pyranine (8-hydroxy-1,3,6-pyranine-thiosulfonic acid) (Peña *et al.*, 1995; Höfer *et al.*, 1996) introduced by

Table 1. CO₂ (mM) accumulated at different values of the external pH, with glucose or ethanol as substrates, with or without the addition of KCl.

	Initial external pH			
	4.5		7.5	
	Control	Plus KCl	Control	Plus KCl
Glucose	150	185 (23%)	173	218 (26%)
Ethanol	43	57 (32%)	35	43 (23%)
Increase by K ⁺ with glucose		35		45
Increase by K ⁺ with ethanol		14		8

100 mg of cells were incubated in 5 ml of a medium containing 100 mM glucose without shaking, or 8.6 mM ethanol, shaking in a 25 ml Erlenmeyer flask, 30 mM KCl (when indicated). The media were buffered with 10 mM triethanolamine (TEA) adjusted to pH 7.5 with tartaric acid, or 10 mM tartaric acid adjusted with TEA to pH 4.5. The cells were incubated for 15 min at 30°C in a controlled temperature water bath. After incubation the suspension was centrifuged and the supernatant and/or the pellet were used for the measurement of CO₂. When indicated, 10 mM propionic acid, adjusted to the desired pH were added. Standard deviation was less than 10% in seven separate experiments in duplicate. Values in parentheses indicate the percentage increases in CO₂ concentration with K⁺.

electroporation, which was carried out with a Bio-Rad Gene Pulser, with pulse controller, using a mixture of 0.7 ml of the cell suspension, plus 20 µl of 100 mM pyranine. A pulse of 1500 V with a capacitance of 25 µF and a resistance of 200 Ω was applied, lasting approximately 3.0 msec. Then the cells were centrifuged and washed three times in a Beckman microfuge for 10 s and resuspended to its original concentration of 0.5 g/ml, and were employed as indicated in each experiment. The fluorescence changes at 460–520 nm were followed in a DMX-1000 spectrofluorometer (SLM Instruments, Urbana, IL, with a temperature-controlled sample compartment (30°C) (Calahorra *et al.*, 1998).

External pH measurements

The external pH was measured by following the changes of the medium with a pH electrode connected to a pH meter. The incubation mixture is provided in each experiment.

Carbonic anhydrase measurements

The activity of this enzyme was performed by incubating a cell extract obtained by vortexing of the cells with glass beads, according to Funayama *et al.* (1980). Carbonic anhydrase was quantified as follows: 300 µl of the cell extract were added to 10 mM triethanolamine buffer, pH 8.0, and bromothymol blue to an optical density of 0.5. To this mixture, 500 µl of ice-cold water saturated

with a constant flow of CO₂ was added, and the colour change was followed at 620 nm. As a positive control of the method, an extract of erythrocytes was also used. Final volume was 2.0 ml under constant stirring at 30°C.

RESULTS

The measurement of ionic contents and other parameters was performed after an incubation of 15 min, when the cells had reached a steady state and no further important net changes could be detected in ion accumulation. Table 1 shows, as expected, that the total CO₂ content of the cells incubated in the presence of glucose was higher than that with ethanol as substrate. These results are in agreement with those reported previously by Conway and Downey (1950) and Peña *et al.* (1969). Also, with glucose as substrate, when the pH was increased, CO₂ accumulation increased; with ethanol, by contrast, this accumulation showed a slight decrease at the high pH. The presence of potassium had similar effects, increasing the CO₂ concentration at both pH values, in spite of the fact that it does not stimulate fermentation or respiration at high pH values (Rothstein and Demis, 1953; Peña *et al.*, 1972). The percentage increase in the accumulation of CO₂ (around 30%) was similar at both pH values; however, the increase in absolute values was higher when the substrate was glucose than with ethanol.

Table 2. Intracellular potassium concentration (mM) in cells incubated at both pH values with glucose or ethanol as substrates.

	Initial external pH			
	4.5		7.5	
	Control	Plus KCl	Control	Plus KCl
Glucose	194	264 (36%)	192	266 (39%)
Ethanol	186	240 (32%)	194	220 (13%)
Increase with glucose		70		78
Increase with ethanol		44		26

Experimental conditions were similar to those of Table 1. Results are the mean of three different experiments, with a standard deviation lower than 10%. Values in parentheses are the percentage increases with KCl.

The experiment described in Table 2 allowed us to verify that in fact, as described by Ryan (1971), under our conditions cells incubated with different carbon sources accumulated different amounts of K^+ , but it was considered important to carry out the experiments at both high and low pH, since the relative distribution of carbonic acid and bicarbonate between the medium and the cell interior should be different at both pH values. Results showed that when 30 mM of the cation was present, a greater accumulation was observed at both pH values with glucose than with ethanol. With ethanol as substrate, if K^+ was not present in the medium, a small amount of the cation was lost by the cells at the lower pH. It is necessary to point out that the ATP content was higher with glucose than with ethanol as substrate, which were in the absence of K^+ , in μM per gram of cell, 3.1 with glucose and 2.1 with ethanol as substrates, and 2.75 and 2.0 in the presence of K^+ for glucose and ethanol, respectively, as the mean of two experiments.

As shown in Tables 1 and 2, the intracellular content of CO_2 , increased both with glucose and ethanol in the same direction as K^+ . However, quantitatively, the potassium ion increases were higher. It was considered important to define the internal pH values, in order to correlate them with the distribution of CO_2 ; the results are shown in Table 3. It is important to stress that with the method used (Peña *et al.*, 1995), the cytoplasmic pH was measured.

As reported before (Peña *et al.*, 1995), the internal pH of the cells, under comparable conditions, was higher with glucose than with ethanol as substrate; this is apparently contradictory, because

the former generates high concentrations of CO_2 and consequently carbonic acid from it. Also, when the internal pH values of the cells were calculated from the distribution of carbonic acid/bicarbonate (Table 4), higher values were obtained than those measured by the fluorescence changes of pyranine. This fact already indicates that the distribution of this important pair of substrates implies additional factors (see below).

Yeast cells during fermentation notably acidify the medium (Conway and O'Malley, 1946); this is partly due to the production of H_2CO_3 , but also to the pumping of protons from the cell interior by the H^+ -ATPase, or by the expulsion of other organic acids; for this reason it was decided also to measure the changes of the external pH. Table 5

Table 3. Internal pH values of yeast cells incubated with glucose and ethanol, measured with pyranine electroporated into the cells.

	Initial external pH			
	4.5		7.5	
	Control	Plus KCl	Control	Plus KCl
Glucose	6.22	6.55	6.80	6.75
Ethanol	5.90	6.30	6.55	6.70

25 mg of cells were incubated in 10 mM tartrate-TEA buffer, pH 4.5 or TEA-tartrate buffer, pH 7.5; 10 mM glucose or 8.6 mM ethanol. Pyranine was electroporated into the cells as described under Methods. Fluorescence changes were measured at 460–520 nm in a spectrofluorometer at 30°C. pH values were calculated as described by Peña *et al.* (1995) and Calahorra *et al.* (1998). Where indicated, 30 mM KCl was added. Values shown were obtained after an incubation of 15 min.

Table 4. Values of the internal pH of yeast obtained from the distribution of H₂CO₃ and bicarbonate, according to the internal and external pH values of the cell.

	Initial external pH			
	4.5		7.5	
	Control	Plus KCl	Control	Plus KCl
Glucose	7.9	8.0	7.8	8.0
Ethanol	8.0	8.5	8.7	8.9

100 mg of cells were incubated in 5 ml of a medium containing 100 mM glucose without shaking, or 8.6 mM ethanol, shaking in a 25 ml Erlenmeyer flask, 30 mM KCl (when indicated). The media were buffered with 10 mM triethanolamine (TEA) adjusted to pH 7.5 with tartaric acid, or 10 mM tartaric acid adjusted with TEA to pH 4.5. The cells were incubated for 15 min at 30°C in a controlled temperature water bath. After incubation the suspension was centrifuged and the supernatant and/or the pellet were used for the measurement of CO₂, and of the external pH to calculate the distribution of H₂CO₃ and HCO₃⁻ inside the cells, and from there, the internal pH by means of the Henderson Hasselbalch equation. 6.35 was taken as the value for the pK of carbonic acid. The results were obtained from the data of Figures 1 and 5.

Table 5. External pH values after 15 min, of incubation with glucose or ethanol as substrates.

	Initial external pH			
	4.5		7.5	
	Control	Plus KCl	Control	Plus KCl
Glucose	4.4	3.4	5.7	5.3
Ethanol	4.4	4.3	6.9	6.8

100 mg of cells were incubated in 5 ml of a medium containing 100 mM glucose without shaking, or 8.6 mM ethanol, in a 25 ml Erlenmeyer flask, 30 mM KCl (when indicated). The media were buffered with 10 mM triethanolamine (TEA) adjusted to pH 7.5 with tartaric acid, or 10 mM tartaric acid adjusted with TEA to pH 4.5. The cells were incubated for 15 min at 30°C in a controlled temperature water bath. After incubation the suspension was centrifuged and the supernatant and/or the pellet were used for the measurement of pH with a pH meter.

shows the values of the external pH of the cellular suspensions after 15 min of incubation. An important acidification of the medium was observed, which corresponded to a significant pH gradient at both sides of the cell membrane. In addition, the decrease of the external pH was larger when the initial pH was higher, in agreement with the results

Table 6. Effect of varying propionic acid concentrations on K⁺ accumulation (mM) with glucose or ethanol as substrates.

Propionic acid, mM	Initial external pH			
	Glucose		Ethanol	
	4.5	7.5	4.5	7.5
0	304	314	258	248
5	304	314	277	293
10	309	320	309	309
20	309	314	309	308
30	309	315	307	309

100 mg of cells were incubated as described for Table 1 during 10 min, in the presence of 30 mM KCl and then 10 mM of propionic acid was added, continuing the incubation for another 10 min. Then the cells were centrifuged and their internal CO₂ concentration was measured as described under Methods. Results are the mean of two different experiments.

of Peña *et al.* (1972). This is particularly notable with glucose as the substrate. Although in pure water a much smaller amount of H⁺ is required to change the pH from 4.5 to 3.4 (2.85×10^{-4} M/l) than from 7.5 to 5.3 (4.98×10^{-6} M/l), this experiment was carried out in a buffered medium, and by titration it can be easily shown that the larger decrease of the pH starting at pH 7.5 represents a larger amount of protons pumped out from the cells, also coincident with an increase of the internal pH.

Ryan and Ryan (1972) measured the effect of different concentrations of propionic acid on the accumulation of potassium and on the intracellular pH, concluding that the acidification produced by the entrance of protonated propionic acid releases the transport system from the alkalization of the cell contents, which was supposed to be the limiting step for potassium transport. Table 6 shows that when glucose was the substrate, and in the presence of 30 mM K⁺, the addition of different concentrations of propionic acid did not increase the accumulation of K⁺. On the other hand, when ethanol was the substrate, a significant increase of the accumulation was observed, reaching a maximum at around 10 mM propionic acid.

Since the cells incubated with glucose as substrate have a much higher content of CO₂, and the addition of propionate with this substrate did not increase their K⁺ content, it was decided to study the effect of propionic acid on the concentration of

Table 7. Effects of propionic acid on the CO₂ (mM) accumulated by cells with glucose or ethanol as substrates at both pH values of the medium.

Propionic acid added, mM	Initial medium pH			
	Glucose		Ethanol	
	4.5	7.5	4.5	7.5
0	185	218	57	43
5	127	171	56	28
10	118	189	42	30
20	120	189	42	32
30	127	190	43	33

100 mg of cells were incubated as described for Table 1 for 10 min with 30 mM KCl, and then 10 mM of propionic acid was added, continuing the incubation for another 10 min. Then the cells were centrifuged and their internal CO₂ concentration was measured as described under Methods. Results are the mean of two different experiments.

Table 8. ¹⁴C-propionic acid accumulation (mM) by yeast cells with glucose or ethanol as substrates at two different pH values.

Initial pH	4.5	4.5 plus K ⁺	7.5	7.5 plus K ⁺
Glucose	19	22	19	23
Ethanol	21	25	20	22

100 mg of cells were incubated as described for Table 1 for 10 min, and then 10 mM of propionic acid was added, continuing the incubation for another 10 min. Where indicated, 30 mM KCl was present. Then the cells were filtered and the radioactivity was measured in a scintillation counter. Results are the mean of three different experiments.

CO₂ in the cells incubated with glucose or ethanol at both pH values of the medium, expecting that propionate would substitute for carbonic acid-bicarbonate. In fact, the addition of the acid produced a decrease of the total CO₂ accumulated, which was significantly higher when the substrate was glucose (Table 7). On the other hand, ¹⁴C-propionic acid accumulated similarly with glucose or ethanol as substrates (Table 8).

The cells incubated in the presence of glucose accumulated high concentrations of the non-diffusible anion bicarbonate, which may increase the membrane potential difference in the plasma membrane of yeast because of a Donnan effect, resulting from the accumulation of the negative charges of non diffusible bicarbonate (Figure 1). The membrane potential difference should be smaller with ethanol as substrate, which allows the

cells to accumulate smaller amounts of the anion; thus, it was decided to estimate this parameter by following the fluorescence of the cyanine DiSC₃(3). It was also expected that with ethanol as substrate, the membrane potential difference would increase by the addition of propionate with this substrate. As Figure 2 shows, first, the fluorescence with ethanol was lower than with glucose; indicating a higher membrane potential difference with glucose, and second, the addition of propionate produced an increase in the signal in the presence of ethanol. The addition of propionate, as expected, did not produce an increase of the fluorescence of the cyanine when glucose was the substrate. This experiment was carried out at different times of addition of propionic acid, with similar results (not shown).

DISCUSSION

Accumulation of K⁺ at both pH values

The data presented are in general agreement with those of former authors. However, although the increases of bicarbonate and of K⁺ are in the same direction, the coincidence was not stoichiometric. Calculation of the bicarbonate concentrations from the data of Table 1, after subtraction of the dissolved CO₂ produced the results shown in Table 4. Conway and Brady (1950) stated that there is a direct relation between the bicarbonate and K⁺ accumulation, and this did not hold for our experimental conditions. Quantitatively, our data are more in agreement with the statement of Ryan *et al.* (1971) and Ryan and Ryan (1972), who postulated an indirect relation, according to them depending on the values of the internal pH as the limiting factor for the accumulation of the cation. However, our remaining results indicate that there are other factors involved in this phenomenon.

Also, a higher accumulation of K⁺ was observed at the higher pH values of the medium, which at least partially could be explained by the findings of who demonstrated a competition between K⁺ and H⁺, which may be independent of the effect of the anions. However, this is a kinetic factor affecting flux rates, but may not have a clear effect on the accumulation of the cation under our steady state conditions after 15 min of incubation. It is also possible that the efflux of K⁺ at the high pH, observed by Van de Mortel *et al.* (1988), did not occur or was compensated by the influx of the cation under our experimental conditions.

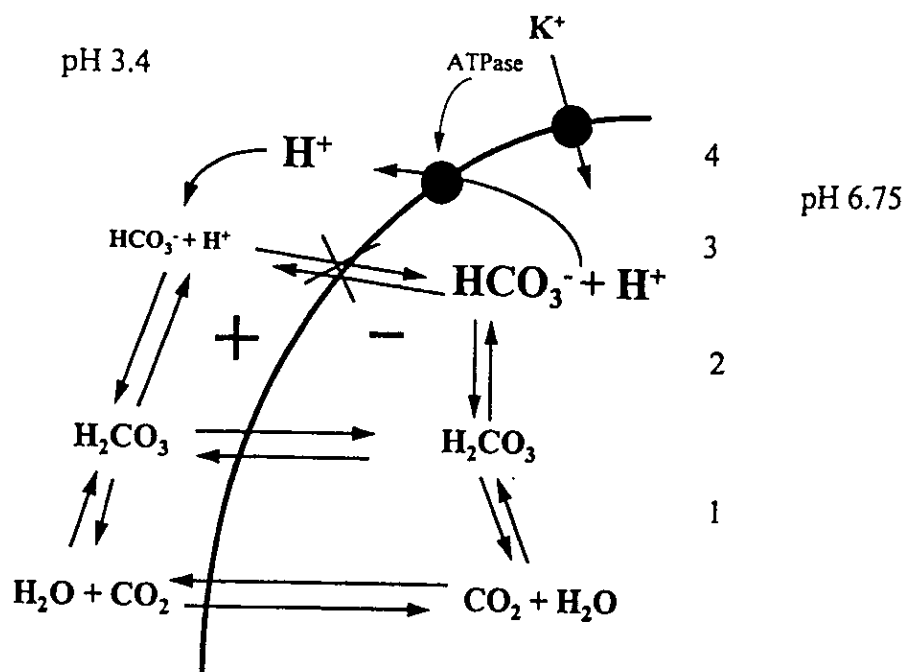


Figure 1. Scheme representing the Donnan effect. On the assumption that decarboxylation reactions produce CO_2 , this is spontaneously hydrated to H_2CO_3 (1), which then dissociates into bicarbonate and one proton (2); the proton is expelled by the H^+ -ATPase of the plasma membrane (3), which lowers the external pH and increases it inside. Carbonic acid is supposed to diffuse freely through the plasma membrane, while bicarbonate does not. At the high internal pH (6.75 in the figure), carbonic acid dissociation is displaced to produce bicarbonate. At the lower external pH (3.4 in the figure), the predominant species is carbonic acid. Since bicarbonate cannot diffuse, it remains inside, generating an additional electric potential, which may drive more K^+ inside through its carrier.

Particularly at the low pH incubation conditions, the explanation of Ryan *et al.* (1971) and Ryan and Ryan (1972) did not appear to hold, in view of the values of the internal pH observed with ethanol, which were always lower than those obtained with glucose. If the increase of the internal pH resulting from the accumulation of K^+ were the limiting factor for the uptake of this cation, one would expect that the uptake of K^+ were lower with glucose than with ethanol, and our results showed the contrary situation for this parameter.

The addition of propionic acid 10 min after starting incubation of the cells with glucose or ethanol showed that the accumulation of the cation did not change with glucose but increased when the substrate was ethanol, again in agreement with the data of Ryan *et al.* (1971) and Ryan and Ryan (1972). It was also found that when glucose was the substrate, the addition of propionic acid produced a decrease of the CO_2 concen-

tration within the cells, indicating perhaps that propionate substituted for bicarbonate under these conditions. Another factor which may be involved in the higher accumulation of potassium with glucose than with ethanol is the higher production of anions with the former, which can be observed starting with the formation of the intermediaries of glycolysis, particularly of the sugar phosphates (Peña *et al.*, 1969, 1972), and that of succinate demonstrated by Conway and Brady (1950). Besides, the concentrations of the anion forms of weak acids within the cell must be lower with ethanol as substrate, due to the lower internal pH prevailing with this substrate. It was also found that the ATP concentration of the cells was lower when ethanol was the substrate than with glucose. Still another factor which may be involved is the stimulation of the H^+ -ATPase of the plasma membrane produced by glucose (Serrano, 1983).

Our data indicate that due to the equilibrium of CO_2 in solution and the formation of H_2CO_3 at the

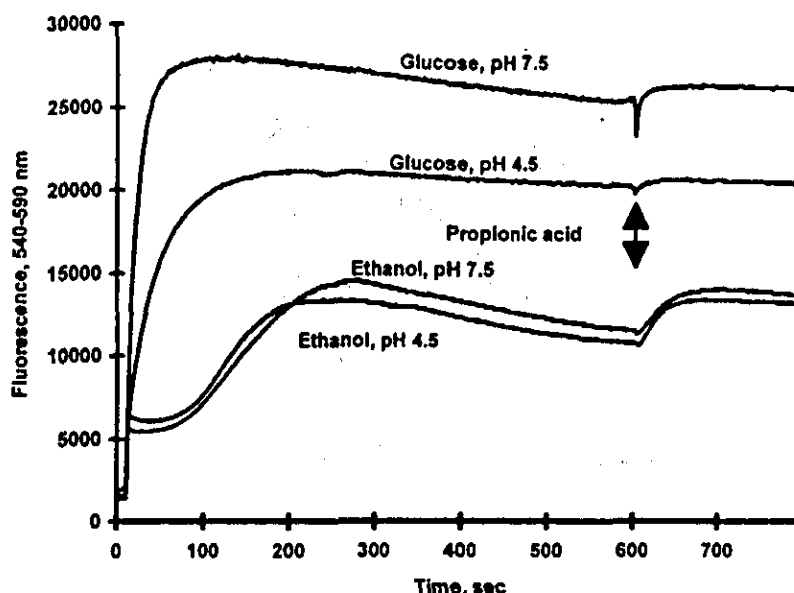


Figure 2. Changes of the membrane potential produced by the addition of propionic acid to cells incubated with glucose or ethanol as substrates. 25 mg of cells were added to the following medium: 100 mM glucose or 8.6 mM ethanol; 10 mM triethanolamine adjusted to pH 7.5 with tartaric acid, or 10 mM tartaric acid adjusted to pH 4.5 with triethanolamine; 10 μ M pentachlorophenol, 10 μ M CaCl_2 (Peña *et al.*, 1984). Final volume was 2.0 ml, temperature 30°C. Where indicated, 10 mM propionic acid was added.

internal pH values reached during metabolism, the formation of the anion HCO_3^- is favoured in different degrees. It is possible that the accumulation of this anion in large amounts may favour the accumulation of K^+ by generating a concentration gradient of a non-diffusible negative charge, according to a Donnan equilibrium. This phenomenon appears to be more important at the low values of the external pH, when the ratio of internal to external bicarbonate concentrations reached higher values. It is possible that by this mechanism of passive accumulation of a non-diffusible anion, yeast may indirectly use the pH gradient without the need of a H^+/K^+ symporter such as that found in *Neurospora* (Rodríguez-Navarro *et al.*, 1986). This same explanation can be given to the increased accumulation of K^+ when the cells were incubated with ethanol as substrate and propionic acid was added to the medium. The experimental proof for this assumption was obtained by the estimation of the membrane potential of the cells and the changes produced by the addition of propionic acid, both with glucose or ethanol as substrates. In fact, when the latter was the substrate, upon the addition of

propionic acid, a significant increase of the fluorescence of the cyanine used to estimate the membrane potential was observed. This increase of the fluorescence of the cyanine was not observed with glucose.

There is still another consideration to the data, referring to the higher value of the internal pH observed with glucose as substrate, in spite of the fact that with this substrate high amounts of CO_2 are produced, which can be hydrated to carbonic acid, dissociating then to HCO_3^- plus H^+ . There are other factors which can be invoked to explain this phenomenon, one of which is the stimulation of the H^+ -ATPase produced by glucose (Serrano, 1983). Also, at the high pH values of the medium, the ATPase is stimulated, even in the absence of K^+ (Peña *et al.*, 1972). This stimulation of the ATPase was also observed by incubating the cells at low pH values with glucose (Eraso and Gancedo, 1987).

Another fact to be considered is that the values of the internal pH of the cells measured by the distribution of carbonic acid were higher than those measured by the fluorescent dye pyranine. Results on the measurement of this parameter by

means of electroporated pyranine indicate that this method is accurate enough to measure internal pH, producing results in accordance to different methods (Peña *et al.*, 1995; Calahorra *et al.*, 1998; Preston *et al.*, 1989; Haworth and Fliegel, 1993; Höfer *et al.*, 1996). Moreover, the calculations for the internal pH under extreme conditions (in the presence of K⁺, and at an initial external pH of 7.5 produced by this method an internal pH close to 9, which appears to be unacceptable, by its value itself, and also because of the disagreement with the results of the above mentioned authors. If this is accepted, it appears that there are other factors involved in the accumulation of bicarbonate within the cell, and not only the distribution of both carbonic acid and bicarbonate by the free diffusion of CO₂ and carbonic acid, according to the relative values of the pH in the different cellular compartments. It should be pointed out that the distribution of bicarbonate and carbonic acid between the cytoplasm and the vacuole according to their pH values, in any case, should be the opposite to what was observed, since the latter compartment is more acidic. One possible explanation for this finding could be that of a retention mechanism for bicarbonate within the cells, perhaps considering the vacuole as the main candidate for bicarbonate accumulation, because of its size and inverted membrane potential, positive inside. However, this phenomenon deserves further exploration.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was partially supported by Grants Nos IN-202193 and IN-207696 from the Dirección General de Asuntos del Personal Académico of this University, and No. 3188N-N93-7 from the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología de México.

REFERENCES

- Blatt, M. R., Rodríguez-Navarro, A. and Slayman, C. L. (1987). Potassium-proton symport in *Neurospora*: kinetic control by pH and membrane potential. *J. Membr. Biol.* **98**, 169–189.
- Calahorra, M., Martínez, G. A., Hernández-Cruz, A. and Peña, A. (1998). Values of yeast cytoplasmic and vacuolar pH, the influence of monovalent cations. *Yeast* **14**, 505–515.
- Conway, E. J. and Brady, T. G. (1950). Biological production of acid and alkali. I. Quantitative relations of succinic and carbonic acids to the potassium and hydrogen ion exchange in fermenting yeast. *Biochem. J.* **47**, 360–369.
- Conway, E. J., Brady, T. G. and Carton, E. (1950). Biological production of acid and alkali. II. A redox theory for the process in yeast with application to the production of gastric acidity. *Biochem. J.* **47**, 369–374.
- Conway, E. J. and Downey, M. (1950). pH values of the yeast cell. *Biochem. J.* **47**, 355–360.
- Conway, E. J. and O'Malley, E. (1946). The nature of the cation exchanges during yeast fermentation, with formation of 0.02 N-H ion. *Biochem. J.* **40**, 59–67.
- Cooper, T. G., Tchen, T. T., Wood, H. G. and Benedict, C. R. (1968). The carboxylation of phosphoenolpyruvate and pyruvate. I. The active species of CO₂ utilized by phosphoenolpyruvate carboxylase, carboxytransphosphorylase and pyruvate carboxylase. *J. Biol. Chem.* **243**, 3857–3863.
- Eraso, P. and Gancedo, C. (1987). Activation of yeast plasma membrane ATPase by acid pH during growth. *FEBS Lett.* **224**, 187–192.
- Funayama, S., Gancedo, J. M. and Gancedo, C. (1980). Turnover of yeast fructose-bisphosphatase in different metabolic conditions. *Eur. J. Biochem.* **109**, 61–66.
- Haworth, R. S. and Fliegel, L. (1993). Intracellular pH in *Schizosaccharomyces pombe*—comparison with *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biochem.* **124**, 131–140.
- Höfer, M., Calahorra, M. and Peña, A. (1996). Assessment of $\Delta\mu_{H^+}$ in *Schizosaccharomyces pombe*; intracellular inclusion of impermeable agents by electroporation. *Folia Microbiol.* **41**, 98–100.
- Krebs, H. A. and Roughton, F. J. W. (1948). Carbonic anhydrase as a tool in studying the mechanism of reactions involving H₂CO₃, CO₂ or HCO₃⁻. *Biochem. J.* **43**, 550–555.
- Peña, A. (1975). Studies on the mechanism of K⁺ transport in yeast. *Arch. Biochem. Biophys.* **167**, 397–407.
- Peña, A., Cinco, G., Gómez-Puyou, A. and Tuena, M. (1969). Studies on the mechanism of stimulation of glycolysis and respiration by K⁺ in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim. Biophys. Acta* **180**, 1–8.
- Peña, A., Cinco, G., Gómez-Puyou, A. and Tuena, M. (1972). Effects of the pH of the incubation medium on glycolysis and respiration in *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch. Biochem. Biophys.* **153**, 413–425.
- Peña, A., Ramírez, J., Rosas, G. and Calahorra, M. (1995). Proton pumping and the internal pH of yeast cells, measured with pyranine introduced by electroporation. *J. Bacteriol.* **177**, 1017–1022.
- Peña, A., Uribe, S., Pardo, J. P. and Borbollá, M. (1984). The use of a cyanine dye in measuring membrane potential in yeast. *Arch. Biochem. Biophys.* **231**, 217–225.
- Preston, R. A., Murphy, R. F. and Jones, E. W. (1989). Assay of vacuolar pH in yeast and identification of acidification-defective mutants. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **86**, 7027–7031.

- Rodriguez-Navarro, A., Blatt, M. R. and Slayman, C. L. (1986). A potassium-proton symport in *Neurospora crassa*. *J. Gen. Physiol.* **87**, 649-674.
- Rothstein, A. and Demis, C. (1953). The relationship of the cell surface to metabolism. The stimulation of fermentation by extracellular potassium. *Arch. Biochem. Biophys.* **44**, 18-29.
- Ryan, H., Ryan, J. P. and O'Connor, W. H. (1971). The effect of diffusible acids on potassium ions uptake by yeast. *Biochem. J.* **125**, 1081-1085.
- Ryan, J. P. and Ryan, H. (1972). The role of intracellular pH in the regulation of cation exchanges in yeast. *Biochem. J.* **128**, 139-146.
- Serrano, R. (1983). *In vivo* glucose activation of the yeast plasma membrane ATPase. *FEBS Lett.* **156**, 11-14.
- Van de Mortel, J. B. J., Mulders, D., Korthout, H., Theuvenet, A. P. R. and Borst-Pauwels, G. W. F. H. (1988). Transient hyperpolarization of yeast by glucose and ethanol. *Biochim. Biophys. Acta* **936**, 421-428.

Potassium ion efflux induced by cationic compounds in yeast

Emanuel Enriquez-Freire *, Ruth López, Antonio Peña

Departamento de Genética y Biología Molecular, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado 70-600, 04510 México, D.F., Mexico

Received 26 November 1998; received in revised form 22 January 1999; accepted 28 January 1999

Abstract

Potassium efflux in yeast induced by several cationic compounds showed different characteristics. All of the observed efflux required glucose as substrate at the concentrations used. For most of them, the phenomenon required binding of the cationic compound to the cell surface and increased with the negative cell surface charge, and for all the compounds tested, it depended on a metabolizable substrate. Efflux induced with terbium chloride appeared more likely due to the function of a K^+/H^+ antiporter. With DEAE-dextran and dihydrostreptomycin, potassium efflux was dependent on the cell potassium content and was also sensitive to osmotic changes of the medium. DEAE-dextran-provoked efflux was not due to cell disruption. Dihydrostreptomycin seemed to activate a potassium efflux system which could not be studied in isolation, but its inhibition of potassium uptake may also be involved. Except for cells treated with ethidium bromide, no appreciable cell disruption was observed. The potassium efflux observed appears to be a membrane phenomenon reversible after washing with magnesium chloride. © 1999 Elsevier Science B.V. All rights reserved.

Keywords: Potassium ion efflux; cationic compound; (*Saccharomyces cerevisiae*)

1. Introduction

Studies by Rothstein and Bruce [1,2] described a potassium efflux system in yeast. An energy-dependent efflux system for potassium ions in yeast was also demonstrated by Peña and Ramirez [3]. This efflux system was stimulated by glucose or ethanol; it was also stimulated, in a substrate-dependent manner, by cationic molecules like ethidium bromide and other cationic dyes [4], dihydrostreptomycin [3], diethylaminoethyl-dextran [5], and lanthanide cations and

other trivalent cations such as Al^{3+} [3]. The efflux produced by terbium ions appeared to be mainly of electroneutral nature and ascribed to the operation of a K^+/H^+ exchanger [3].

Work by Gustin et al. [6] and Bertl and Slayman [7] based on patch-clamp analysis revealed the presence of both a mechanosensitive ion channel and an outward rectifying K^+ channel; the latter was identified as a pH-sensitive, depolarization-activated, outwardly-rectifying potassium channel, or TOK1 [8] or DUK1 [9] or YORK [10] or YKC1 [11] channel, with properties apparently different from those of the mechanosensitive ion channel [11].

Using yeast plasma membrane vesicles, Ramirez et al. [12] and Camarasa et al. [13] provided evidence for a K^+/H^+ exchanger, which may be involved in the regulation of the internal pH of the cells when

* Corresponding author:
E-mail: apd@ifisiol.unam.mx

they accumulate high concentrations of K^+ [12]. The J0909 gene from chromosome X reported by Miosga et al. [14] predicts an 873-residue protein with sequence similarity with the putative *Enterococcus hirae* Na^+/H^+ antiporter and the putative K^+/H^+ KefC antiporter of *Escherichia coli*. Yet, the sequence of a *Saccharomyces cerevisiae* gene on chromosome IV likely encodes a Na^+/H^+ antiporter [15].

These findings prompted studies on the potassium efflux mechanisms, regulation and energetic requirements of the efflux system. In this context, cationic dyes and other molecules [3,4] have been used as a tools to reveal the interactions governing potassium efflux. In the present work, we used four structurally unrelated cationic compounds to learn more about the mode of action of these compounds and their kind of interactions with yeast cells.

2. Materials and methods

2.1. Yeast and growth conditions

The yeast *Saccharomyces cerevisiae*, isolated as a single colony from a commercial product (La Azteca, Mexico) was used for this work. Cells were grown in 500 ml of YPD medium (1% yeast extract, 2% peptone and 2% glucose) during 24 h in a gyratory shaker placed in a controlled temperature room at 30°C. They were collected and washed twice with distilled water by centrifugation. The resulting pellet was resuspended in distilled water (10%, w/w) and aerated by incubation in the same gyratory shaker during 14 h. The cells were collected again, washed twice by centrifugation and resuspended in water to a ratio of 0.5 g per ml and kept on ice until used, during the course of the same day.

2.2. External potassium determinations

K^+ movements were measured by continuously recording its external concentration with a potassium-selective electrode. Data were captured using software specially designed for that use in our laboratory. Determinations were made in 10 ml of an incubation medium consisting of 2 mM MES-TEA (pH 6.0), 10 mM glucose and 25 mg of fresh cells.

2.3. Proton pumping activity

Proton pumping activity was continuously recorded using a pH electrode. Conditions were similar to those used for external potassium determinations.

2.4. Internal pH

This parameter was followed by measuring the fluorescence changes of pyranine (8-hydroxy-1,3,6-pyrene-thiosulfonic acid) introduced by electroporation, which was carried out with a Bio-Rad gene pulser, with a pulse controller, using a mixture of 0.7 ml of the cell suspension, plus 20 μ l of 100 mM pyranine. A pulse of 1500 V with a capacitance of 25 μ F and a resistance of 200 Ω was applied, lasting approximately 3 ms. Then the cells were centrifuged, washed three times in a Beckman microfuge for 10 s and resuspended to its original concentration of 0.5 g/ml. The fluorescence changes at 460–520 nm were followed in a DMX-1000 spectrofluorimeter (SLM Instruments, Urbana, IL), with a temperature-controlled sample compartment (30°C) [16].

2.5. Estimation of the membrane potential

Membrane potential was estimated by following the fluorescence changes of 0.25 μ M of the cyanine DiSC₃(3) (dithiocarbocyanine, Molecular Probes) at 540–590 nm [17] in the DMX-1000 spectrofluorimeter (SLM Instruments) with a cell compartment controlled at 30°C and an acquisition and processing system. 25 mg of cells were incubated in 2.0 ml of the following medium: 50 mM glucose, 10 mM MES-TEA (pH 6.0), 10 μ M pentachlorophenol and 10 mM $CaCl_2$.

2.6. Rubidium uptake experiments

The experiments were carried out as follows: 50 mg of fresh cells were incubated in 1 ml of a medium containing 5 mM MES-TEA (pH 6.0) buffer, 50 mM glucose, and different concentrations of ⁸⁶RbCl ranging from 50 μ M to 20 mM. 100- μ l samples were withdrawn at 15, 30 and 45 s, 1, 2, 4 and 8 min, and filtered through a Millipore filter (0.45 μ m mean pore size). Filters were washed twice with

20 mM KCl and then dried. Radioactivity was measured in a Beckman LS6500 scintillation counter. From these data plotted against time, the initial uptake rates were obtained. Inhibition experiments were performed as indicated previously, but the incubation medium contained 50 μ M ethidium bromide (EB), 50 μ M dihydrostreptomycin (DHS), 50 μ g diethylaminoethyl-dextran (DEAE-D) or 20 μ M terbium chloride additional to the rest of the components.

2.7. Surface charge determinations

Surface charge determinations were made according to Theuvenet et al. [18]. Two μ M 9-aminoacridine was added to a medium containing 2 mM MES-TEA buffer (pH 6.0), 1 μ M antimycin A, different concentrations of any of the cationic compounds (from 1 to 100 μ M) and 25 mg of fresh cells. The cells were centrifuged immediately after mixing and the supernatant was collected for fluorometric determinations of the 9-aminoacridine using the wavelength pair for excitation and emission, 400 nm and 454 nm, respectively. The surface charge was calculated from the difference after measurement with 10 mM $MgCl_2$. 9-Aminoacridine binding versus concentration of the cationic compounds plots were built and from these plots the concentration of the cationic compound inhibiting half 9-aminoacridine binding was calculated.

2.8. Loading of cells with $^{86}Rb^+$

Six grams of fresh cells were diluted at 10% in a 10 mM glucose solution, 3 000 000 dpm of 100 mM ^{86}Rb were added, and the incubation mixture was transferred to Falcon tubes and incubated during 24 h with continuous shaking at 4°C. After this time, cells were centrifuged and washed twice with distilled water and resuspended at 50% w/v for use in the Rb^+ efflux experiments.

2.9. Rb^+ efflux determinations

Cells loaded with $^{86}Rb^+$ were used to determine the efflux of the cation. Fifty mg of $^{86}Rb^+$ preloaded cells were incubated in 1 ml of a medium containing 5 mM MES-TEA buffer (pH 6.0) and 50 mM glu-

cose, with or without any of the following cationic compounds: 50 μ M $TbCl_3$, 50 μ M DHS, 50 μ M EB or 50 μ g DEAE-D. After an incubation at 30°C for 5 min, 100- μ l samples were withdrawn and filtered through a millipore filter (0.45 μ m mean pore size). Filters were washed twice with 20 mM KCl, dried in air and the radioactivity was measured in a Beckman LS6500 scintillation counter. $^{86}Rb^+$ loss was determined as the difference between the control without cationic compound and those with the cationic compounds added. $^{86}Rb^+$ content in the control remained unchanged after 30 min incubation.

2.10. Terbium binding determinations

Terbium binding determinations and maximal binding of terbium and dissociation constant estimations were made by measuring the free concentration of Tb^{3+} remaining after incubation of the cells as follows: 25 mg of fresh cells were placed in 5 ml of a medium containing 5 mM MES-TEA (pH 6.0) and different concentrations of terbium chloride, from 2 μ M to 30 μ M. Cells were incubated for 1 min and then centrifuged; the supernatant was used for terbium determinations. Terbium concentration was measured adding different aliquots of the supernatant to 20 μ M dipicolinic acid, in 5 mM MES-TEA (pH 6.0), in a final volume of 5.0 ml. fluorescence was measured at 276–545 nm as the excitation and emission wavelengths, respectively. Fluorescence values were compared to a standard curve prepared with known concentrations of $TbCl_3$. The cation forms a fluorescent adduct with dipicolinic acid, and this property of the cation has been successfully used to measure its binding to biological molecules [19].

2.11. Data analysis

All experiments were repeated at least three times, without significant differences. In most cases, typical tracings are shown. For kinetic data, values \pm standard deviation are given. In the case of K^+ movements and pH changes, representative experiments are presented. Values of K_m and K_d were obtained by nonlinear regression (Inplot program) and fitted best to a rectangular hyperbola with one component. Dispersion of the data gave a maximum value of

15%. K_d is the concentration value of terbium chloride necessary to attain 50% of the maximum binding.

3. Results

The efflux of potassium ions to a potassium-free medium is a common response of the cells to the presence of some cationic compounds [3,4]. This can be observed only if an adequate substrate is present in the medium (Fig. 1A). As Fig. 1B shows, in the absence of glucose, at the concentrations of the cationic agents used, no potassium efflux was detected in the presence of DHS, EB, DEAE-D or $TbCl_3$. In the presence of glucose, at the concentrations used, this efflux showed in some instances a variable delayed response of 20 to 30 s, and after this time a steep efflux was observed. The response consisted of a transient inhibition of the potassium efflux in the presence of glucose, more or less coincident with the building of the membrane potential. It is worthwhile to mention that a dependence exists between the extent of potassium efflux and the time of fasting of the cells, which modifies the internal content of potassium (see below).

Potassium efflux induced by the addition of cationic compounds was tested for its dependence on

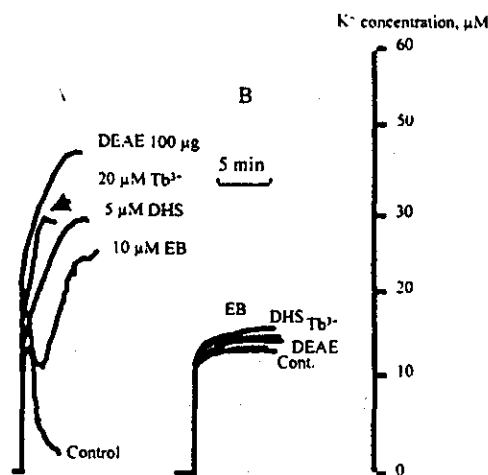


Fig. 1. Potassium efflux produced by different cationic agents: glucose requirement. Incubation conditions: 2 mM MES-TEA buffer (pH 6.0), 10 mM glucose. Final volume was 10.0 ml. 25 mg of yeast (wet weight) was added after a few seconds of incubation. In B, glucose was omitted. K^+ concentration was followed with a K^+ -selective cationic electrode.

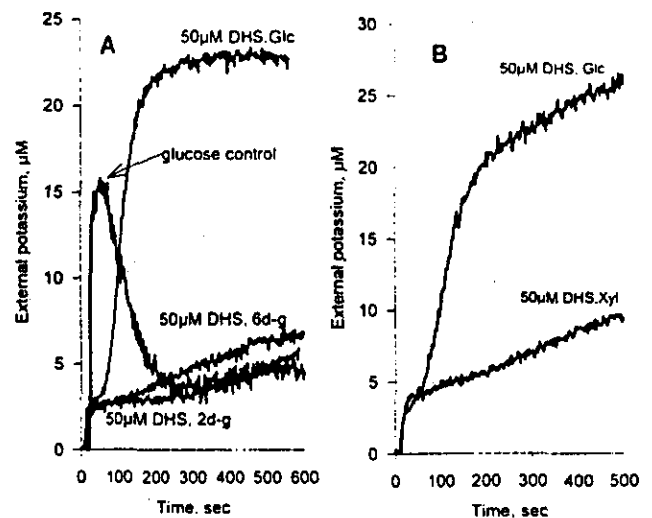


Fig. 2. K^+ efflux produced by DHS with different substrates. Potassium efflux was determined with a potassium-selective electrode. Incubation medium: 10 mM glucose, 2 mM MES-TEA buffer (pH 6.0); final volume, 10.0 ml. Where indicated, 10 mM 2-deoxyglucose and 6-deoxyglucose (A) and 10 mM xylose (B) were added instead of glucose.

glucose metabolism or a related event thereafter, and it was found dependent on this substrate. The efflux was not observed using 2-deoxy-D-glucose or 6-deoxy-D-glucose instead of glucose which can not be metabolized by yeast. Fig. 2A, shows the results with DHS, which were similar with the other agents (data not shown). No effect was also observed when using a poorly utilized substrate (xylose); results of Fig. 2B also show this fact. None of the substitutes for glucose used could support the efflux of potassium to the extent observed when using this substrate, indicating a metabolism-derived link as responsible for this efflux. Similar results were obtained when DEAE-D was used instead of DHS.

As Fig. 3 shows, an increase in the efflux of potassium with most cationic compounds was observed in the presence of EDTA. In the presence of this chelator, which increases the negative surface charge of the cells, potassium efflux was increased with EB and DHS. On the other hand, no change in the efflux of potassium promoted by DEAE-D was observed. The addition of EDTA, on the other hand, prevented potassium efflux by Tb^{3+} , probably because of the complexation of the cation by EDTA.

These results indicated that a negative surface charge might be involved in the efflux of potassium

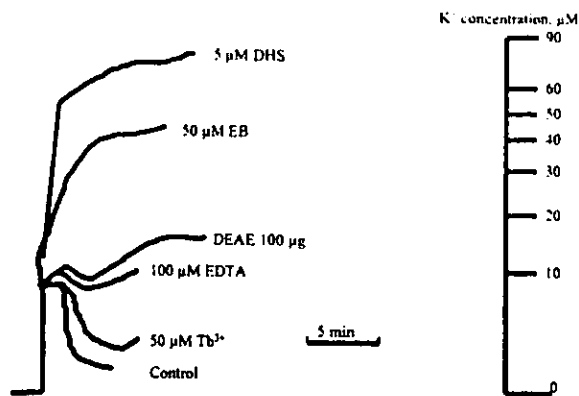


Fig. 3. Efflux of potassium produced by different cationic compounds in the presence of 100 μM EDTA. Incubation medium: 10 mM glucose, 2 mM MES-TEA buffer (pH 6.0); final volume, 10.0 ml.

when treating cells with cationic compounds; they agree with those earlier reported by Elferink and Booij [20]. Results in Table 1 agree with those of Fig. 3, in the sense that cationic compounds may be binding to negative surface charges, as shown by their ability to displace 9-aminoacridine from binding to the cells. We measured this capacity as the concentration of the cationic compound necessary to inhibit 50% binding of the dye to the cell surface; a correlation was found between the affinity of the cationic compound for the negative surface charge and the extent of potassium efflux they promoted. However, DEAE-D showed a low affinity for the negative groups of the cell surface; as a consequence, with this agent, no differences in the efflux of potassium were expected with an increased cell surface charge due to EDTA presence (Fig. 3).

Table 1
Concentrations of cationic compounds inhibiting 50% of 9-aminoacridine binding

Addition	ID ₅₀
Dihydrostreptomycin	$5 \pm 2.3 \mu\text{M}$
Terbium chloride	$10 \pm 6.1 \mu\text{M}$
DEAE-dextran	$300 \pm 56 \mu\text{g/ml}$

The binding of 9-aminoacridine to the cells was determined according to Theuvenet et al. [18]. 2 μM 9-aminoacridine was added to a medium containing 2 mM MES-TEA (pH 6.0); 1 μM antimycin A, different concentrations of any of the cationic compounds (1 to 100 μM) and 25 mg of fresh cells. The cells were centrifuged immediately after mixing with 9-aminoacridine and the supernatant was collected for the spectrofluorimetric determination of the free dye.

From these results we could expect that if the negative cell surface charge was blocked, then no efflux of potassium would result by treatment of the cells with cationic compounds. Results of Table 2 are consistent with this view; if 1 mM MgCl_2 was present at the same time as the cationic compound, less potassium efflux was promoted by the cationic compound. It is important to mention that 1 mM MgCl_2 did not significantly affect potassium efflux or uptake in control experiments.

Measurements of terbium ion binding in the presence and absence of glucose were carried out, to define if the presence of the substrate could increase either the number or affinity of negative surface charges of the cells for the cations. Results showed no differences due to the presence of glucose. Maximal binding of terbium, and its dissociation constant in the absence of glucose were $2.15 \pm 0.57 \text{ nmol/mg}$ of fresh cells and $9.49 \pm 0.42 \mu\text{M}$, respectively, when terbium was preincubated for 1 min. In the presence of glucose and after incubating terbium during 1 min maximal binding of terbium was $2.08 \pm 0.46 \text{ nmol/mg}$ (wet weight) of cells, with a dissociation constant of $8.48 \pm 1.35 \mu\text{M}$. These results indicate that glucose does not promote any appreciable change in cell surface charge that could be detected with this method, based on the determination of residual terbium with dipicolinic acid [19].

In order to define if the cationic compounds could be removed from the cells, the experiment shown on Table 3 was carried out. The cells were incubated for 5 min with the respective cationic compound; after this time cells were collected by centrifugation, then

Table 2
Effect of MgCl_2 on K^+ efflux produced by several cationic compounds

Treatment	Total efflux, nmol
Control	95 ± 23
1 mM MgCl_2	110 ± 32
50 μg DEAE-D	260 ± 42
50 μg DEAE-D, 1 mM MgCl_2	45 ± 12
50 μM DHS	315 ± 45
50 μM DHS, 1 mM MgCl_2	78 ± 23

K^+ efflux was measured by means of a potassium-selective electrode in a medium containing 25 mg (wet weight) of cells, 2 mM MES-TEA (pH 6.0), 10 mM glucose and where stated, 1 mM MgCl_2 and the respective concentration of the cationic compound. Final volume was 10 ml.

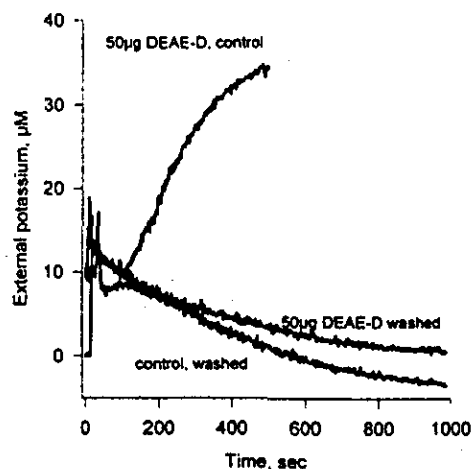


Fig. 4. Reversibility of the effect of DEAE-D by washing of the cells with $MgCl_2$. 50 mg (wet weight) of cells previously incubated with DEAE-D during 5 min were washed twice with 1 mM $MgCl_2$ and then washed with distilled water, and used for potassium efflux determinations with a potassium-selective electrode. Incubation conditions were the same as used in Fig. 1.

washed once with 1 mM $MgCl_2$ and twice with distilled water; the cells so treated were used for continuous recording of potassium in the presence of 10 μM KCl. The effect of DEAE-D disappeared after washing (Fig. 4). To a minor extent, treatment with dihydrostreptomycin could also be blocked as a re-

Table 3

Reversion of the effects of cationic compounds by washing with magnesium chloride

Treatment	External potassium (μM)
Control, washed	3.5 ± 1.3
20 μM $TbCl_3$	30 ± 8.4
20 μM $TbCl_3$, washed	12.5 ± 4.2
DEAE-D, 50 $\mu g/ml$	28 ± 13
DEAE-D, 50 $\mu g/ml$, washed	4 ± 1.9
50 μM DHS	33 ± 14
50 μM DHS, washed	13 ± 5.6
50 μM EB	40 ± 15
50 μM EB, washed	24 ± 7.3

25 mg (wet weight) of cells were treated with the respective concentrations of the cationic compounds in a medium containing 2 mM MES-TEA (pH 6), 10 mM glucose, during 5 min. After this time, the cells were collected by centrifugation in a microfuge, suspended in 1 mM $MgCl_2$, centrifuged and washed twice with distilled water. The cells were then incubated in 10 ml of medium containing 2 mM MES-TEA (pH 6), 10 mM glucose and 10 μM KCl for continuous recording of external potassium with a potassium-selective electrode. Values presented were obtained after 10 min of this second incubation.

sult of washing. In this case the recordings also show a slow uptake of the potassium externally added. On the contrary, washing the cells treated with ethidium bromide or Tb^{3+} did not produce the disappearance of the effect promoted by the cationic compounds.

The efflux of potassium might be attributed to the operation of a K^+/H^+ exchanger and also the mechanosensitive ion channel that can transport K^+ and H^+ [3,6]. This prompted the necessity of assaying the effect of cationic compounds on the internal pH and proton pumping activity. The method developed by Peña et al. [16] was used to measure the internal pH. Results on Table 4 show that DEAE-D and DHS both promoted a negligible, if any, increase in the internal pH, showing small differences between the two agents tested. On the contrary, $TbCl_3$ promoted a high internal acidification of the cell. That is, cationic compounds showed a differential effect on the cell pH; in spite of the fact that potassium efflux was the common element.

In agreement with the results of Table 4, the increase of the cell pH appeared to correspond to a proton pumping activity. Fig. 5 shows that both DEAE-D and DHS promoted a negligible increase of the proton pumping activity and this results agree with those of Table 4 in the sense that the increase in cell pH is the result of a higher proton pumping activity. On the other hand, terbium chloride diminished proton pumping activity (data not shown), in agreement with the decrease found of the internal pH value and previous results [3] (Table 4).

Table 4

Effect of the cationic compounds on internal cell pH using pyranine, introduced by electroporation as an indicator

Treatment	Internal pH
Control	6.5
DHS, 50 μM	6.6
DHS, 100 μM	6.65
$TbCl_3$, 50 μM	6.15
$TbCl_3$, 100 μM	6.12
DEAE-D, 25 $\mu g/ml$	6.7
DEAE-D, 50 $\mu g/ml$	6.75

0.7 ml of a 50% cell suspension was electroporated in the presence of 20 μl of 100 mM pyranine with a pulse of 3 ms of 1500 V at 25 μF and 200 Ω . Electroporated cells were washed three times with distilled water. Fluorescence at 460–520 nm was measured, using 25 mg (wet weight) of cells in a medium containing 2 mM MES-TEA (pH 6), 10 mM glucose and the indicated concentrations of each of the cationic compounds.

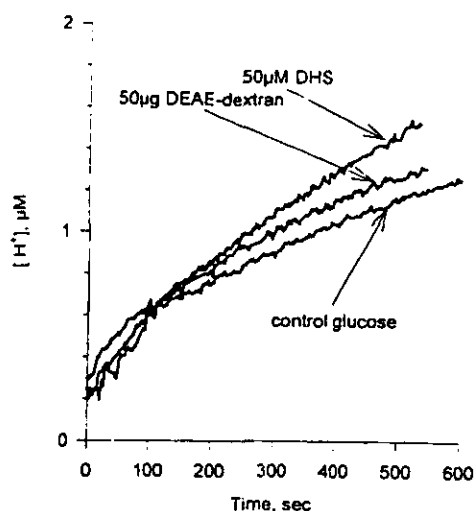


Fig. 5. Effects of DEAE-D and DHS on proton pumping by yeast. H^+ concentration was continuously recorded with a pH electrode in a medium similar to that of Fig. 1, with 50 mg of fresh cells. Where indicated, 50 μM DHS or 50 μg DEAE-D was added to the medium.

The efflux of potassium induced by DEAE-D and DHS also showed to be sensitive to changes in the osmotic pressure of the medium or to differences of osmotic pressure between the internal and external compartments (Fig. 6). When the cells were incubated with 0.8 M sorbitol, the efflux of potassium induced with 50 μg of DEAE-D was abolished; also glucose-induced potassium efflux was abolished completely. However, with DHS, only half of the potassium efflux was abolished in the presence of 0.8 M sorbitol. Similar results were obtained when 0.8 M galactose, a nonmetabolizable sugar by these cells was used instead of sorbitol, and no differences with the results of Fig. 6 could be noted; that is, galactose also abolished totally the efflux of potassium induced by DEAE-D and partially that produced with DHS. The measurement of respiratory rates by our starved cells (data not shown) showed that sorbitol was not used as a substrate by yeast and also did not interfere with glucose utilization. With these two agents, also changes in the transport kinetics of $^{86}Rb^+$ uptake were observed; DEAE-D affected V_{max} for Rb^+ uptake, but not K_m ; V_{max} was 18.3 ± 3.2 in its absence, and 8.0 ± 0.96 nmol/mg fresh cells/min in the presence of 50 μg of DEAE-D and the K_m varied only from 0.8 ± 0.32 to 0.5 ± 0.2 mM. DHS also diminished the V_{max} for Rb^+ uptake to 4.96 ± 1.96 nmol/mg fresh cells/min with 50 μM of DHS and

the K_m (0.77 ± 0.28 mM) did not show any increase, in agreement with previous results [21].

Cell disruption was assessed by two methods: by measuring absorbency at 260 nm of material leaking out of the cells, using as the control 200 μM CTAB (data not shown) (this method was not used with ethidium bromide, because of its absorbency at the wavelength used). We also measured $^{86}Rb^+$ efflux in cells preloaded with $^{86}RbCl$ during 24 h; after this time $15 \pm 4.5\%$ of the total cell potassium had been replaced with $^{86}Rb^+$. An efflux in the range of 1–3% was observed when incubating the cells for 5 min 50 μM DHS, 50 μg of DEAE-D or 50 μM $TbCl_3$. However, incubation with 50 μM ethidium bromide under the same conditions promoted a $30 \pm 5.6\%$ loss of ^{86}Rb . It is important to point out that discrimination for K^+ over $^{86}Rb^+$ exists, judging from the failure of cationic compounds to promote a higher efflux of ^{86}Rb . In order to define if the effect of EB on K^+ efflux was only due to cell disruption or also to the competitive inhibition of monovalent cation transport by this agent, we measured the effect of this dye on Rb^+ transport: The K_m for the transport of the monovalent cation in the presence of EB was 3.6 ± 1.7 mM, as compared to 0.8 ± 0.32 mM for the

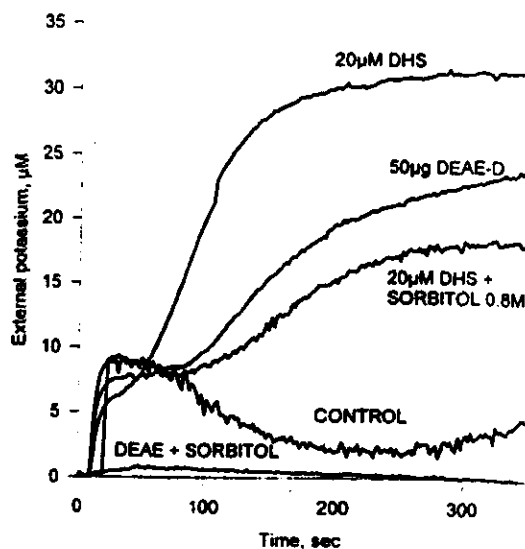


Fig. 6. Effects of 0.8 M sorbitol on potassium efflux produced by DEAE-D and DHS. Potassium efflux was followed continuously with a potassium-selective electrode in a medium and conditions similar to those of Fig. 1. Where indicated, 0.8 M sorbitol and/or 20 μM DHS and 50 μg of DEAE-D were present in the medium.

control, and the V_{\max} of 13.8 ± 2.7 and 18.3 ± 3.2 nmol/mg of fresh cells/min in the presence $50 \mu\text{M}$ of EB or in its absence, respectively.

Measurements of membrane potential using a fluorescent cyanine as a probe [17] showed no significant changes of this parameter using cationic compounds at concentrations of $20\text{--}50 \mu\text{M}$ which promoted potassium efflux. Only concentrations of TbCl_3 50-fold higher (2.5 mM) quenched $28 \pm 3.3\%$ the fluorescence of the control; under similar conditions, 2.5 mM DHS only produced a decrease of $11 \pm 5\%$. DEAE-D used at the same concentration inducing potassium efflux ($50 \mu\text{g}$) only quenched 4% of the fluorescence, compared with 20 mM of KCl that quenched $16 \pm 3.9\%$ of the same control.

The efflux of potassium induced by cationic compounds showed a response depending on the cellular potassium concentration; when cell potassium decreased, a decreased efflux of potassium by DEAE-D and TbCl_3 was observed (data not shown). Our results showed that at a cell K^+ content of 256 mM , treating the cells for 5 min with $100 \mu\text{g}$ of DEAE-D an efflux of 11% of the cell potassium was produced; when cellular potassium was 116 mM , no efflux of potassium could be measured. For $100 \mu\text{M}$ TbCl_3 , with a cellular potassium concentration of 215 mM , an efflux of 12% was observed, and with a cellular potassium concentration of 164 mM no efflux of potassium was observed. With EB and DHS, the response was independent of the cellular potassium. With these agents, no changes in the efflux were found in relation to cell potassium: with $100 \mu\text{M}$ DHS, for a cellular potassium of 271 and 153 mM , 16% and 13% of efflux was produced, respectively.

4. Discussion

The results presented here show that the several cationic compounds used promoted efflux of potassium with certain particularities, which probably derived from the kind of interaction with yeast cells and response elements involved in the phenomenon. For the agents used, the phenomenon appears to be unrelated to their structure, and mainly related to their charge. However, the mechanisms by which they produced K^+ efflux appear to be different; in fact, some other cations which have been tested, con-

taining in their structure a guanido group, sulfaguanidine and arginine, for instance, did not produce a potassium efflux (data not shown), but alkylguanidines do [21]. This may indicate that the potassium efflux induced by cationic compounds is not derived from a generalized effect due to their interaction with cell surface negative charges; it appears to depend on different mechanisms characteristic to each agent, although for most of them the effect appears to involve the negative charges on the cell surface.

The experiments showed that binding of most of the cationic compounds to the negative surface charges of the cell was necessary for the phenomenon to occur, since some of the agents could be removed from the surface of the cell by washing with MgCl_2 , showing that the efflux of potassium occurred at the level of the cell membrane. Our experiments also show that although a generalized increase of surface charge produced by EDTA favored the cationic compound binding, this is not, in all cases, a factor defining the efflux of potassium, since with DEAE-D, the presence of the chelator prevented its effect.

As previously reported [3], the efflux of potassium induced by cationic compounds showed glucose dependence as a common characteristic to all those tested, as well as to others already reported [4,21]. This dependence was not only due to transport of the substrate, because it was not observed when two transportable nonmetabolizable sugar analogues were used instead of glucose. It was also not due to a decrease of the internal pH as a result of phosphorylation of glucose or the nonmetabolizable analogue 2-deoxyglucose; if this were the case, potassium efflux should have been observed with this glucose derivative, which is phosphorylated. The efflux of potassium appears to depend on a glucose-induced establishment of a membrane potential difference; this may be inferred because when the cells were treated with DEAE-D, DHS and EB, these compounds induced a delayed response of glucose-dependent potassium efflux, approximately similar to that required for the establishment of a membrane potential, as shown by the use of the fluorescent cyanine $\text{DiSC}_3(3)$ [17]. However, it is possible that some other event related to metabolism of glucose may be involved.

Regarding the requirement of glucose to observe the effects of the cationic agents tested, another pos-

sibility was explored: a glucose-dependent increase of the negative surface charge. However, this possibility does not apply to all the cationic compounds tested, because when the surface charge was increased by EDTA treatment the effect of DEAE-D diminished, indicating that for this agent, other mechanisms are involved, although a cell surface increase should favor DEAE-D binding over the entire cell surface, because of its cationic nature. On the other hand, the effect of this compound was greatly diminished by the presence of $MgCl_2$. Also, the presence of glucose did not appear to modify the negative surface potential of the cells (see below).

Another likely explanation to reconcile these apparently contradictory results may be that glucose promotes the accessibility of particular negative charges in the vicinity of potassium transporters, making them accessible to the cationic compounds, some of which have been shown to produce an effect upon the kinetics of ion transport [22]. Except for the case of DEAE-D, this was supported by the enhanced effects of the agents in the presence of EDTA, that promotes a generalized increase of negative surface charges. Differences of DEAE-D against DHS and EB could be attributable to differences in affinity for surface charges, or other factors involved in DEAE-D binding, perhaps due to its sugar nature.

Measurement of the surface charge with 9-amino-2-fluorenyl acridine showed that, in fact, the different agents did not displace this dye from the negative charges on the surface, but again, DEAE-D was the exception. In the presence of glucose, the measurement of surface charge with this dye is difficult because the dye is taken up by the cells in the presence of glucose, as revealed by clear changes of its fluorescence during longer incubations (data not shown). However, measurement of terbium ion binding can be taken as an indication of the surface charge of the cells, and it showed no differences in the presence or absence of glucose. Neither maximal binding of terbium, nor its dissociation constant were modified in the presence of glucose as compared with control cells. These results indicate that glucose does not promote any appreciable change in cell surface, but, as mentioned before, discrete changes in the vicinity of transporters which may not have been detected with our method cannot be ruled out.

An additional finding of the experiments is that

Tb^{3+} did not appear to be significantly washed from the cells, and it is not transported into the cells (data not shown). This opens the possibility to use this cation to measure the negative surface charge of the cells under different conditions, in a similar way as has been used to measure its binding to biological molecules [19]. This procedure is currently under further study in our laboratory.

Previous reports showed that cationic compounds like mercury ion [23] methylene blue [24], ethidium bromide [25] and some other compounds [26] induced an all-or-none effect in the cells, attributing potassium efflux to cell disruption. In this respect, it was confirmed that EB promoted cell disruption, but the rest of the cationic compounds tested, at the concentrations used, did not promote the disruption of the cells, as revealed by the amount of material absorbing at 260 nm as an indication of nucleotides leaking from the cells together with K^+ . Also, disruption of the cells should have produced a leak of $^{86}Rb^+$, and no reversion of the effect on potassium efflux after washing should have been seen. Moreover, glucose dependence of potassium efflux and the increase of cell pH induced by the treatment are inconsistent with this mechanism. In summary, of the cations tested here, only EB, in agreement with other authors [23–25], seemed to produce cell disruption. With this agent, as well as in the case of DHS and DEAE, another factor may be involved; that is, a competitive inhibition of Rb^+ uptake [27].

Potassium efflux, especially with DEAE-D and DHS, was found to be modified by changes in the osmotic pressure of the medium with several sugars, and no efflux could be produced when the cells had a diminished cell potassium content. This is important to note, in view of previous reports [5] ascribing to DEAE-D a selective disruption of the plasma membrane, leaving intact the internal membranes of the cells in the presence of sorbitol. This behavior of the cells was not confirmed in our experiments, which is interesting, and may be due to the strain of yeast cells used.

DEAE-D, and DHS to a lesser extent, both induced potassium efflux through a mechanism apparently not related to the operation of a K^+/H^+ exchanger, but to another mechanism that can produce the efflux of potassium ions. Several possibilities exist, one of which could be the activation of an ion

channel [6]; however, from our results it is not evident that a voltage-dependent potassium channel [7–11] may be activated as a result of binding or the efflux of K^+ produced by the cationic compounds, because no appreciable changes on membrane potential were observed after binding.

Perhaps the most interesting results were those obtained with terbium chloride, which are consistent with a stimulating effect of this cationic compound on a putative K^+/H^+ antiporter [12,13] producing the extrusion of K^+ ions; this agent promoted potassium efflux concomitantly with cell acidification and had no appreciable effect on the membrane potential. None of the other cationic compounds tested showed this stimulating effect over a putative K^+/H^+ antiporter.

It is also important to point out that, except for EB, which produced the disruption of the cells, some specificity of the cation efflux system exists, since all other compounds produced a high efflux of K^+ , and only a very small one for $^{86}Rb^+$.

Acknowledgements

This work was partially supported by Grants IN207696 from the Dirección General de Asuntos del Personal Académico, of this University, and 400346-5-3282PN from the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, de México.

References

- [1] A. Rothstein, M. Bruce, The potassium efflux and influx in yeast at different potassium concentrations, *J. Cell. Comp. Physiol.* 51 (1958) 145–159.
- [2] A. Rothstein, M. Bruce, The efflux of potassium from yeast cells into a potassium free medium, *J. Cell. Comp. Physiol.* 51 (1958) 439–455.
- [3] A. Peña, J. Ramirez, An energy-dependent efflux for potassium ions in yeast, *Biochim. Biophys. Acta* 1068 (1991) 237–244.
- [4] A. Peña, M.A. Mora, N. Carrasco, Uptake and effects of several cationic dyes on yeast, *J. Membr. Biol.* 47 (1979) 261–284.
- [5] V. Huber-Wälchli, A. Wiemken, Differential extraction of soluble pools from the cytosol and the vacuoles of yeast (*Candida utilis*) using DEAE-dextran, *Arch. Microbiol.* 120 (1979) 141–149.
- [6] M.C. Gustin, X.L. Zhou, B. Martinac, Ch. Kung, A mechanosensitive ion channel in the yeast plasma membrane, *Science* 242 (1988) 762–765.
- [7] A. Bertl, C.L. Slayman, Complex modulation of cation channels in the tonoplast and plasma membrane of *Saccharomyces cerevisiae*: single-channel studies, *J. Exp. Biol.* 172 (1992) 271–287.
- [8] K.A. Ketchum, W.J. Joiner, A.J. Sellers, L.K. Kaczmarek, S.A.N. Goldstein, A new family of outwardly rectifying potassium channel proteins with two pore domains in tandem, *Nature* 376 (1995) 690–695.
- [9] J.D. Reid, W. Lukas, R. Shafaatian, A. Bertl, C. Scheurmann-Kettner, H.R. Guy, A. North, The *S. cerevisiae* outwardly-rectifying potassium channel (DUK1) identifies a new family of channels with duplicated pore domains, *Receptors Channels* 4 (1996) 51–62.
- [10] F. Lesage, E. Guillemare, M. Fink, F. Duprat, M. Lazdunski, G. Romey, J. Barhanin, A pH-sensitive yeast outward rectifier K^+ channel with two pore domains and novel gating properties, *J. Biol. Chem.* 271, (8) (1996) 4183–4187.
- [11] X.L. Zhou, B. Vaillant, S.H. Loukin, Ch. Kung, Y. Saimi, YKCl encodes the depolarization-activated K^+ channel in the plasma membrane of yeast, *FEBS Lett.* 373 (1995) 170–176.
- [12] J. Ramirez, A. Peña, M. Montero-Lomeli, H^+/K^+ exchange in reconstituted yeast plasma membrane vesicles, *Biochim. Biophys. Acta* 1285 (1996) 175–182.
- [13] C. Camarasa, S. Prieto, R. Ros, J.M. Salmon, P. Barre, Evidence for a selective and electroneutral K^+/H^+ -exchange in *Saccharomyces cerevisiae* using plasma membrane vesicles, *Yeast* 12 (1996) 1301–1313.
- [14] T. Miosga, A. Witzel, F.K. Zimmermann, Sequence and Function Analysis of a 9.46 kb fragment of *Saccharomyces cerevisiae* chromosome X, *Yeast* 10 (1994) 965–973.
- [15] B. André, An overview of membrane transport proteins in *Saccharomyces cerevisiae*, *Yeast* 11 (1995) 1575–1611.
- [16] A. Peña, J. Ramirez, G. Rosas, M. Calahorra, Proton pumping and the internal pH of yeast cells, measured with pyranine introduced by electroporation, *J. Bacteriol.* 177, (4) (1995) 1017–1022.
- [17] A. Peña, S. Uribe, J.P. Pardo, M. Borbolla, The use of a cyanine dye in measuring membrane potential in yeast, *Arch. Biochem. Biophys.* 231, (1) (1984) 217–225.
- [18] A.P.R. Theuvenet, W.M.H. van de Wijngaard, J.W. van de Rijke, G.W.F.H. Borst-Pauwels, Application of 9-aminoacridine as a probe of the surface potential experienced by cation transporters in the plasma membrane of yeast cells, *Biochim. Biophys. Acta* 775 (1984) 161–168.
- [19] T.D. Barela, A.D. Sherry, A simple, one-step fluorometric method for determination of nanomolar concentrations of terbium, *Anal. Biochem.* 71 (1976) 351–357.
- [20] J.G.R. Elferink, H.L. Booij, The action of some triphenylmethane dyes on yeast and erythrocyte membranes, *Arzneim. Forsch.* 25 (1975) 1248–1252.
- [21] A. Peña, M. Borbolla, S. Uribe, N. Carrasco, S.M. Clemente, The Effects of Alkylguanidines on Monovalent Cation

- Transport in Yeast. Proceedings of the Vth International Symposium on Yeast, Pergamon Press, 1981, pp. 485-489.
- [22] G.W.F.H. Borst-Pauwels, Ion transport in yeast, *Biochim. Biophys. Acta* 650 (1981) 88-127.
- [23] G.A.J. Kuypers, G.M. Roomans, Mercury-induced loss of K^+ from yeast cells investigated by electron probe X-ray microanalysis, *J. Gen. Microbiol.* 115 (1979) 13-18.
- [24] H. Passow, A. Rothstein, B. Loewenstein, An all-or-none response in the release of potassium by yeast cells treated with methylene blue and other basic redox dyes, *J. Gen. Physiol.* 43 (1959) 97-107.
- [25] G.W.F.H. Borst-Pauwels, A.P.R. Theuvenet, A.L.H. Stols, All-or-none interactions of inhibitors of the plasma membrane ATPase with *Saccharomyces cerevisiae*, *Biochim. Biophys. Acta* 732 (1983) 186-192.
- [26] A.P.R. Theuvenet, R.J.M. Bindels, J.M.M. van Amelsvoort, G.W.F.H. Borst-Pauwels, A.L.H. Stols, Interaction of ethidium bromide with yeast cells investigated by electron probe X-ray microanalysis, *J. Membr. Biol.* 73 (1983) 131-136.
- [27] A. Peña, G. Ramirez, Interaction of ethidium bromide with the transport system for monovalent cations in yeast, *J. Membr. Biol.* 22 (1975) 369-384.