

00322



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

105

FACULTAD DE CIENCIAS

El transporte de potasio y la regulación del pH intracelular de *Saccharomyces cerevisiae*

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE BIÓLOGO

PRESENTA:

CARLOS LOZANO FLORES

DIRECTOR DE TESIS: Dr. ANTONIO PEÑA DÍAZ.



2003

FACULTAD DE CIENCIAS SECCIÓN ESCOLAR

TESIS CON FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.



DRA. MARÍA DE LOURDES ESTEVA PERALTA
Jefa de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo escrito:

"El transporte de potasio y la regulación del pH intracelular
de *Saccharomyces cerevisiae*".

realizado por **Carlos Lozano Flores**

con número de cuenta 9523101-5, quien cubrió los créditos de la carrera de Biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis
Propietario

Peña
Dr. Antonio Peña Díaz.

Propietario

Ramírez
Dr. Jorge Ramírez Salcedo.

Propietario

Luisa Alba Lois
Dra. Luisa Alba Lois.

Suplente

Victor Manuel Valdéz López
Dr. Victor Manuel Valdéz López.

Suplente

Luis Felipe Jiménez García
Dr. Luis Felipe Jiménez García.

FACULTAD DE CIENCIAS
U N. A. M.

Consejo Departamental de Biología.

Juan Manuel Rodríguez Chávez
M. en C. Juan Manuel Rodríguez Chávez.



DEPARTAMENTO
DE BIOLOGIA

El presente trabajo fue realizado en el Departamento de Genética Molecular del Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la asesoría del Dr. Antonio Peña Díaz. Durante la realización de este trabajo se contó con el apoyo económico proporcionado por el Sistema Nacional de Investigadores como Ayudante de Investigador; además del apoyo otorgado por la Dirección General de Divulgación de la Ciencia, como Divulgador de la Ciencia en UNIVERSUM, UNAM.

Dedicatoria

A mis padres, Lourdes y Victor.

A mis hermanas, Elizabeth y Lucero.

A Malu.

por compartir conmigo los triunfos y derrotas

Agradecimientos.

Porque en cada uno de los diferentes momentos de la realización de este trabajo fui guiado por dos de los más certeros asesores quienes con empeño y paciencia animaron mi desarrollo en este ambito científico, gracias Dr. Antonio Peña y Dr. Jorge Ramirez.

A mis compañeros y amigos de laboratorio, Martha, Carlos, Juan Carlos, Bertha, Daniela, Gloria, Victoriano, Jose, Fernando, Beatriz e Irak por otorgarme siempre, su apoyo incondicional.

A mis amigas Peri, Adriana, Karla, Verónica, Sandra, Beatriz, Ivonne, Diana, Rosa Elsa, Yessenia, Liliانا, Mari Jose, Maripili y Viviana.

A mis amigos Osbaldo, Rodolfo, Israel, Bernardo y Mark.

A todos, ¡¡gracias!!

Índice

	Pag.
RESUMEN.....	4
INTRODUCCIÓN.	
Generalidades sobre las levaduras.....	5
Bioenergética de la levadura.....	6
El transporte de iones.....	7
Transporte primario.....	8
Transporte secundario.....	9
El transporte del potasio.....	9
Proteínas involucradas en el transporte de K ⁺ .	
<i>Trk1p</i> y <i>Trk2p</i> (Transportadores de K ⁺).....	11
<i>Kha1p</i> (antiportador K ⁺ /H ⁺).....	12
<i>Nha1p</i> (antiportador Na ⁺ o K ⁺ /H ⁺).....	12
Participación del potasio en el metabolismo celular.....	13
El pH intracelular.....	13
JUSTIFICACIÓN.....	16
OBJETIVO.	
Objetivo General.....	17
Objetivos Específicos.....	17
MATERIALES Y METODOS.	
Cepas.....	18
Medios de cultivo.....	18
Reactivos stock.....	18
Mutantes:	
Construcción de módulos recombinantes.....	19
PCR para construcción de módulos transformantes.....	20
Construcción de las mutantes.	
Preparación de células competentes y transformación.....	21
Verificación preliminar de las mutantes.	
Mutante simple: <i>Δkha1</i>	22
Mutante simple: <i>Δtrk1</i>	22

Mutante simple: $\Delta trk2$	22
Mutante doble: $\Delta trk1-\Delta kha1$	22
Mutante doble: $\Delta trk1-\Delta trk2$	23
Mutante doble: $\Delta trk2-\Delta kha1$	23
Mutante triple: $\Delta trk1-\Delta trk2-\Delta kha1$	23
Extracción del DNA total.....	23
Comprobación genética de las mutantes construidas.....	24
Caracterización fisiológica de las mutantes.	
Crecimiento celular.....	25
Determinación de potasio intracelular.....	25
Medición de transporte de potasio.....	26
Determinación del bombeo de protones:	
Utilizando un electrodo de pH.....	26
Empleando Púrpura de bromocresol.....	27
Cambios del pH intracelular.....	27
Estimación del potencial de membrana.....	28
Cinética del Transporte de $^{86}\text{Rb}^+$	29
RESULTADOS.....	30
DISCUSIÓN.....	58
CONCLUSIONES.....	62
PERSPECTIVAS.....	63
BIBLIOGRAFÍA.	
Libros y Artículos.....	65
Sitios de WWW.....	70

RESUMEN

El potasio es el catión más abundante dentro de las células; por tanto es el principal determinante de parámetros fisiológicos de la levadura, tales como: volumen celular, turgencia y la actividad enzimática. En la levadura, el K^+ entra por dos proteínas transportadoras, descrita como de alta y baja afinidad (*Trk1p* y *Trk2p*, respectivamente). Datos recientes, muestran que la salida de K^+ , pudiera estar mediada por un antiportador K^+/H^+ (*Khalp*), un canal de K^+ (*Tok1p*) y otro antiportador Na^+/H^+ (*Nhalp*). Así mismo la regulación del pH intracelular pudiera estar relacionada con estas proteínas.

Haciendo ablaciones simples y combinadas de los genes TRK1, TRK2 y KHA1, hemos encontrado que: de forma independiente el producto de TRK1 es el responsable del transporte de K^+ de alta afinidad como ya había sido descrito. Las mutantes de los genes TRK2 y KHA1 presentan un fenotipo semejante a la cepa silvestre; si de los genes anteriores uno se elimina de forma alternada en una mutante $\Delta trk1$, no se afecta el fenotipo descrito para esta mutante; finalmente la mutante triple (TRK1-TRK2-KHA1) es viable y su fenotipo se asemeja también al de la mutante simple del transportador de alta afinidad. Por tanto los genes TRK2 y KHA1 no son necesarios para la célula y su papel en la regulación del K^+ así como del pH intracelular pudiera no ser importante, al menos en las condiciones experimentales que hemos utilizado.

INTRODUCCIÓN.

Generalidades sobre las levaduras.

Saccharomyces spp., es un hongo unicelular, uno de cuyos principales usos consiste en la elaboración del pan, cerveza, vinos y otros productos fermentados, así como el alcohol mismo. Este género de levadura forma parte de la subdivisión *Ascomycotina*; familia *Saccharomycetaceae*; subfamilia *Saccharomycetoideae* (Phaff, *et al.* 1978; Goffeau, *et al.* 1996; Madigan, *et al.* 1997; Walker, 1998). *Saccharomyces sensu stricto* puede dividirse en cuatro especies: *S. bayanus*, *S. cerevisiae*, *S. paradoxus* y *S. pastorianus* (Vaughan-Martini, *et al.* 1993; Walker, 1998). En la actualidad existen 700 especies reconocidas de levaduras, lo cual representa apenas una pequeña fracción de la biodiversidad que sin duda existe (Broach *et al.*, 1991). Sin embargo, las levaduras no son tan ubicuas. Phaff (1978) señala que algunas levaduras exhiben una gran especialización por su hábitat. Para su dispersión, las levaduras no cuentan con ningún organelo o estructura especializada; requieren de la acción mecánica del viento (en forma de aerosol), vectores animales, o la actividad humana (Walker, 1998).

A pesar de no ser tan ubicuas, las levaduras se pueden localizar en cualquier ambiente; terrestre, acuático y hasta aéreo. De manera preferencial se localizan sobre los tejidos vegetales (e.g. *Nematospora spp* y *Ophiostoma ulmii*). Algunas especies son comensales; e.g. *Candida pintolopesii*, *Candida sloffii*, *Cyniclomyces guttulatus* que se asocian al tracto intestinal y *Pityrosporum spp* que se asocia con la piel. También tienen relaciones de tipo parásito-oportunista con los animales (e.g. *Candida albicans*, y otras *Candida spp*), y han adquirido gran importancia por las infecciones que producen en los pacientes inmunodeprimidos. En vida libre, podemos localizarlas en el suelo; un suelo rico puede

contener hasta 40,000 levaduras viables por gramo (e.g. *Lipomyces spp* y *Schwanniomyces spp*). En medios acuáticos, se pueden localizar tanto en agua dulce como salada (e.g. *Candida spp*, *Cryptococcus spp*, *Rhodotorula spp* y *Debaryomyces spp*); algunas levaduras marinas existen a temperaturas de -3 a +13 °C, salinidades superiores al 35% y profundidades de 4,000 metros; normalmente se encuentra una concentración de células de 10-100 levaduras por litro de agua (aunque los números pueden ser mayores según la región de un estuario) (Madigan, *et al.* 1997; Walker, 1998). Muy pocas levaduras tienen preferencias extremófilas, pero hay algunos representantes, levaduras halotolerantes (e.g. *Debaryomyces hansenii*) (Gustafsson, 1976; Ramos, 1999), levaduras osmofílicas (e.g. *Zygosaccharomyces rouxii*, que puede crecer en 40-70% de azúcar)(Walker, 1998).

El primer genoma secuenciado completamente de un eucariote fue el de *Saccharomyces cerevisiae*; que se publicó en 1996. Esta levadura tiene un genoma de 12.1 Mb (equivalente a cuatro milésimas del tamaño del genoma humano) distribuido en 16 cromosomas con alrededor de 6200 genes; de ellos sólo para el 65% de ellos se conoce la proteína que codifican y la función fisiológica que desempeñan (Broach, *et al.* 1991; Goffeau, *et al.* 1996; Entian, *et al.* 1999; Lewin, 2000).

Bioenergética de la levadura.

El principal mecanismo de transformación de energía que caracteriza a *S. cerevisiae* permite clasificarla como un organismo quimiorganotrófico, y su capacidad de vivir en ambientes anóxicos la agrupa como un aerobio facultativo (Broach, *et al.* 1991; Goffeau, *et al.* 1996; Brown, 1999). Este organismo puede utilizar como fuente de carbono azúcares simples, aminoácidos, polioles, ácidos grasos, alcoholes alifáticos, componentes hidrocarbonados, varios compuestos heterocíclicos y poliméricos (Walker, 1998).

S. cerevisiae obtiene su energía principalmente de la glucólisis. Esta vía metabólica es de las más antiguas, ya que se encuentra presente en todos los microorganismos procariontes y eucariontes, además de ser una de las más rápidas y eficientes (Mathews y Van Holde, 1998; Nelson y Cox, 2000). En la glucólisis, en ausencia de oxígeno, la ganancia neta de ATP es de 2 moléculas, por cada molécula de glucosa degradada a etanol (Peña, *et al.*, 1969; Peña, *et al.*, 1972; Walker, 1998). En condiciones aerobias se producen 22 moléculas de ATP por cada molécula de glucosa degradada hasta CO₂ y H₂O (Nicholls, 1987; Peña y Dreyfus, 1990; Arnold, 1998; Wang y Oster, 1998, Yasuda, 1998; Peña, 2000; Nelson y Cox, 2000). Sin embargo, este número puede aumentar a 30 ATPs bajo ciertas condiciones experimentales (Walker, 1998).

El transporte de iones.

En cualquier célula, la membrana plasmática es la primera barrera que encuentran los solutos para poder entrar, debido a su baja constante dieléctrica (Peña, 1986; Damaskin y Petri, 1981). Las moléculas no polares pequeñas pueden pasar fácilmente por la membrana plasmática como resultado de la difusión pasiva (Peña, 1995; Laidler y Meiser, 1998). El transporte de moléculas polares o cargadas requiere de energía, así como de rutas formadas por proteínas (transportadores y canales) (Latorre, *et al.*, 1996; Bertl, *et al.*, 1998).

La comprensión del transporte de iones, a través de la membrana plasmática de *S. cerevisiae*, se inició con los trabajos realizados por Pulver, *et al.* (1940); Hervesy y Nielsen (1941); Conway, *et al.* (1946, 1950, 1954, 1955, 1958); Rothstein, *et al.* (1946, 1953, 1958); Armstrong, *et al.* (1964), entre otros. Pero no fue hasta después de ser propuesta la hipótesis (actualmente teoría) quimiosmótica de Mitchell (1961), que se logró entender la

bioenergética de los sistemas de transporte de iones monovalentes y divalentes (Nicholls, 1987; Garland, 1992). Hoy, con los estudios de cepas mutantes de diversos genes relacionados con el transporte (Paulsen, *et al.*, 1998), se ha logrado comprender algunas particularidades de estos sistemas.

Van Belle y André, 2001, definen el transportoma de *S. cerevisiae* con un total de 320 proteínas de membrana, de las cuales antes, Saier, *et al.* (1998) habían propuesto una forma de ordenar a los presuntos transportadores de *S. cerevisiae*; organizando a los 258 genes conocidos hasta ese momento dentro de 42 familias; clasificación que se apoyó en un criterio filogenético (evolutivo), y un criterio de especificidad por el sustrato (bioquímico).

Estos sistemas de transporte trabajan siguiendo el sentido de los potenciales electroquímicos existentes a través de la membrana, de acuerdo con la teoría de Mitchell (Peña, 1975; Nicholls, 1987). Considerando lo anterior, al transporte de iones lo podemos dividir en: transporte primario y secundario.

Transporte primario,

Este transporte comprende a todo aquel que realizan proteínas de la membrana conectadas directamente a una fuente de energía, como el ATP, la luz o el poder reductor, para transportar solutos en contra de su potencial electroquímico. Ejemplo de estos sistemas son las bombas primarias: F₁-ATPasa, V-ATPasa, P-ATPasa, los transportadores multidrogas y las cadenas transportadoras de electrones de la mitocondria y del cloroplasto (Nicholls, 1987; Peña y Dreyfus, 1990; Arnold, *et al.* 1998; Wang y Oster, 1998; Lodish, *et al.* 2000; Nelson y Cox, 2000, Scheiner-Bobis, 2002).

Transporte secundario,

El transporte secundario corresponde a diversos sistemas de transporte que aprovechan, o bien la simple diferencia de concentración de una sustancia, o el potencial electroquímico generado por el transporte primario. La diferencia de potencial ayuda a transportar a los iones de un lado a otro de la membrana y puede generar grandes diferencias de concentración a ambos lados de la misma. Ejemplo de estos últimos son: los antiportadores, o intercambiadores, como los que intercambian iones monovalentes por protones: M^+/H^+ , uniportadores catiónicos, que permiten el paso de una partícula, y los simportadores, que transportan dos partículas o moléculas simultáneamente en la misma dirección, como los simportadores catión/substrato, H^+ /substrato, etc (Nicholls, 1987; Peña y Dreyfus, 1990; Nelson y Cox, 2000, Hauser, *et al.* 2001).

El transporte del potasio.

El potasio es el catión monovalente más abundante en las células; en la levadura, es el principal determinante de parámetros fisiológicos (Ko, *et al.* 1990; Fairman, *et al.* 1999), tales como el volumen celular, la turgencia y la actividad enzimática (Gaber, *et al.* 1988). Los primeros estudios sobre el transporte de potasio en levaduras, fueron realizados en los años 40's por Pulver y cols.

En la levadura, el transporte de iones K^+ es de tipo secundario; para entrar a la célula necesita de energía (Mitchell, 1978; Peña, 1975) que es suministrada de forma indirecta por el transporte primario (Peña *et al.*, 1969; Peña, A., 1975; Peña y Ramírez, 1991). El transporte primario corre a cargo de una P-ATPasa denominada Pma1p, que se distribuye abundantemente en la membrana plasmática (aproximadamente el 10% del total de las

proteínas de la membrana) (Peña, *et al.*, 1984). El gene *PMA1* se localiza en el cromosoma VII, codifica para una proteína de 99.61 Kda (Miranda M, *et al.* 2002, <http://genome-www4.stanford.edu/cgi-bin/SGD/locus.pl?locus=pma1>). Esta P-ATPasa es sensible al vanadato y al dietilestilbestrol. La ablación de este gene es letal para la célula (Miranda, *et al.*, 1995; Miranda, *et al.*, 2002).

Pma1p hidroliza al ATP para bombear H^+ al medio extracelular; este bombeo de H^+ genera una diferencia de potencial electroquímico (Mitchell, 1961; Peña, 1975; Peña *et al.*, 1981; Peña *et al.*, 1984; Rottenberg y Moreno-Sánchez, 1993) que es aprovechado por la levadura para transportar K^+ y otros sustratos al interior celular. El K^+ es transportado por dos proteínas membranales denominadas *Trk1p* y *Trk2p*, definidas inicialmente como transportadores de alta afinidad y de baja afinidad, respectivamente (Rodríguez-Navarro y Ramos, 1984; López y Peña, 1999; Ramos, 1999).

Se ha observado que alrededor de dos tercios del K^+ transportado al interior celular se regresan al exterior (Rodríguez-Navarro y Ramos, 1984; Ortega y Rodríguez Navarro, 1985), y dado que la concentración interna de K^+ es importante para la célula, se ha reportado en *S. cerevisiae* hay dos sistemas de transporte que permiten controlar la salida de este catión. Una salida se ha atribuido a un canal rectificador saliente denominado *Tok1p* (Miosga, *et al.* 1994; Ketchum, *et al.* 1995; Berl, *et al.* 1998; Fairman, *et al.* 1999; <http://genome-www4.stanford.edu/cgi-bin/SGD/locus.pl?locus=tok1>), mientras que la otra se ha propuesto a dos proteínas antiportadoras M^+/H^+ , denominadas *Kha1p* (Ramírez, *et al.*, 1996; Ramírez, *et al.*, 1998) y *Nha1p* (Prior, *et al.* 1996; Bañuelos, *et al.* 2002).

Proteínas involucradas en el transporte de K^+ .

Trk1p y Trk2p.

Ambos simportadores, pertenecen a la familia TRK, característica de algunos hongos unicelulares (Calero, *et al* 1998). Trk1p, es el transportador de K^+ , considerado de alta afinidad (La K_m propuesta para este simportador es de 24 μM mientras que la V_{max} es de 30 nmol/mg/min) (Ramos, 1999). Propuesta originalmente por Rodríguez-Navarro y Ramos, 1984, clonado y secuenciado por el grupo de Gaber (1988), esta proteína, con un peso molecular de 141 Kda, está compuesta de 1,235 residuos, que se arreglan en 12 cruces transmembranales; el gene se localiza en el cromosoma X, y su ablación no es letal para la célula (<http://genome-www4.stanford.edu/cgi-bin/SGD/locus.pl?locus=trk1>).

El trabajo pionero de Rodríguez-Navarro y Ramos (1984), mostró que la levadura posee dos sistemas de transporte de K^+ , uno de alta afinidad y otro de baja afinidad. El último se denominó Trk2p; presenta una afinidad 2 mM y una muy baja V_{max} de 7 nmol/mg/min (Ramos, *et al.* 1985); fue clonado y secuenciado por Ko, *et al.* 1990. Se localiza el gene en el cromosoma XI, y el tamaño del producto polipeptídico es de 889 residuos, con un peso molecular de 101 Kda. La ablación de este gene tampoco es esencial para la célula (Ramos, *et al.* 1994; Ramos, 1999; <http://genome-www4.stanford.edu/cgi-bin/SGD/locus.pl?locus=trk2>). Datos recientes, proponen que este simportador pueda estar implicado en el transporte de H^+ .

Haro y Rodríguez-Navarro, 2002; proponen que la estructura del simportador de Trk1p es un homodímero, funcionando como un cosimportador, a través del cuál se transportan dos K^+ por cada ciclo de transporte. Estudios teóricos plantean que ambos transportadores

Trk1p y Trk2p puedan estar asociados también, de forma heterodimérica (Stewart y Guy, 1999).

Ambos transportadores son considerados por Mulet, *et al.* (1999) como los de mayor importancia para abatir el potencial de membrana cuando la célula se encuentra en presencia de K^+ .

Kha1p (antiportador K^+/H^+)

Se localiza en el cromosoma X, y el producto polipeptídico del gene tiene un tamaño de 873 residuos de aminoácidos, con un peso molecular de 97 Kda. La ablación de este gene no es letal para la célula (<http://genome-www4.stanford.edu/cgi-bin/SGD/locus.pl?locus=kha1>).

Rothstein y Bruce (1958) ya habían detectado la salida de K^+ pero nunca identificaron a la proteína. Peña y Ramírez (1991) describieron la salida de K^+ de la levadura como un sistema dependiente de energía. Ramírez, *et al.* 1996 describieron la presencia de un sistema antiportador K^+/H^+ presente en la membrana plasmática. Ramírez, *et al.* 1998; caracterizaron el gene *YJL094c* del genoma de *S. cerevisiae*, proponiendo que este gene codifica para un antiportador K^+/H^+ , por lo que lo denominaron *KHA1*. Peña y Ramírez, propusieron que Kha1p cumple un papel importante en la regulación del K^+ intracelular así como de la regulación del pH intracelular.

Nha1p (antiportador Na^+ o K^+/H^+)

El gene se localiza en el cromosoma XII; el producto polipeptídico tiene 985 residuos de aminoácidos, con un peso molecular de 109 Kda. La ablación de este gene no es letal para la célula (Prior, *et al.*, 1996; <http://genome-www4.stanford.edu/cgi-bin/SGD/locus.pl?locus=nha1>).

Este antiportador se localiza en la membrana plasmática; inicialmente se caracterizó como un transportador de Na^+ ya que presenta una alta similaridad con el gene *Sod2* de *Schizosaccharomyces pombe* y con el gene *Z-Soc2* de *Zigosaccharomyces rouxii*. La sobreexpresión de este gene causa resistencia a Na^+ y Li^+ , mientras que su ablación ocasiona una mayor sensibilidad a estos iones. Bañuelos, *et al.* 2002, proponen que este antiportador también esté participando de forma directa en la salida del K^+ intracelular.

Participación del potasio en el metabolismo celular.

Los trabajos de Lasnitki y Sorénky (1935), Pulver y Verzar (1940) y Rothstein, *et al* (1953), demostraron que la presencia de iones de K^+ en el medio de incubación acelera la glucólisis en levaduras y no la acumulación de carbohidratos (Rothstein, *et al.* 1946). Este estímulo en la glucólisis sólo es logrado con iones monovalentes y no con divalentes (Rothstein, 1974); además, esta estimulación se encuentra relacionada con el pH extracelular, así como con la concentración del potasio extracelular (Conway y O'Malley, 1946; Rothstein y Bruce, 1958).

Estudios realizados en las enzimas piruvato cinasa, fosfofructocinasa y acetaldehído deshidrogenasa, muestran que estas moléculas presentan actividad dependiente de la concentración de potasio del medio (Rothstein y Enns, 1946). Los estudios sobre la traducción de las proteínas muestran que exceso de fuerza iónica impide que el ribosoma pueda unirse bastante bien al rRNA (Hirokawa, 2002; Ramakrishnan, 2002).

El pH intracelular.

Existen varios mecanismos implicados en la regulación del pH intracelular, debido a que hay diferentes sistemas de transporte ligados al ciclo de H^+ . El pH intracelular ha sido

estudiado por diversos grupos de investigación; entre ellos el de Conway y cols. (1950), quienes emplearon una técnica en la que no se podía diferenciar entre los valores del pH citoplásmico y el organelar. Slavík (1985), propuso el empleo de colorantes fluorescentes hidrosolubles como indicadores del pH interno de la célula, pero el problema es que tardan en difundir al interior celular. Kano y Fendler (1978), introdujeron la piranina (ácido 8-hidroxi-1,3,6 pireno trisulfónico) dentro de liposomas, logrando detectar cambios en la fluorescencia de este compuesto debido a las modificaciones del pH en el interior de los liposomas. Estos cambios de fluorescencia en la piranina, se deben a la presencia del grupo (-OH) ionizable del compuesto, y son directamente proporcionales al valor de pH entre 5.5 y 8.5. Peña, *et al.* 1995, mediante el empleo de la técnica de electroporación, introdujeron la piranina en las levaduras, observando que el compuesto se localiza en el citoplasma y no en otros compartimentos celulares. En este trabajo se demostró que es posible medir los cambios en el pH citoplásmico, siguiendo los cambios en la fluorescencia de la piranina.

En la levadura, el pH intracelular oscila dentro de 5.77 y 7.39 unidades de pH, independientemente de los cambios en el pH extracelular (que puede llegar a valores cercanos a 3.0 unidades de pH) (Ryan y Ryan, 1972) y de las fluctuaciones en el pH intracelular debido al metabolismo de diferentes sustratos (Rothstein y Enns, 1946). La actividad de la P-ATPasa (Pma1p), es una de las principales actividades que afectan el pH intracelular; ya que Pma1p hidroliza ATP y bombea H^+ al exterior celular, produciendo una alcalinización del interior que debe ser compensada por la acción de otros sistemas que recuperen parte de los H^+ expulsados hacia el interior (antiportadores M^+/H^+ , ejemplo Kha1p y Nha1p). La presencia de ácidos débiles en el interior celular, tales como el ácido carbónico, también deben participar en la regulación del pH intracelular (López, *et al.* 1999; Enríquez-Freire, *et al.* 1999).

Recientemente, se ha retomado el papel de la vacuola en la regulación del pH citoplásmico (Calahorra, *et al.*, 1998) ya que en la membrana vacuolar se ha detectado una proteína con actividad de antiportador de Na^+/H^+ denominado Nhx1p. Esta proteína también puede regular la osmolaridad celular, así como ayudar al mantenimiento del pH citoplásmico; ya que mueve el Na^+ del citoplasma al interior de la vacuola, en un intercambio con H^+ de la vacuola al citoplasma (Nass y Rao, 1998).

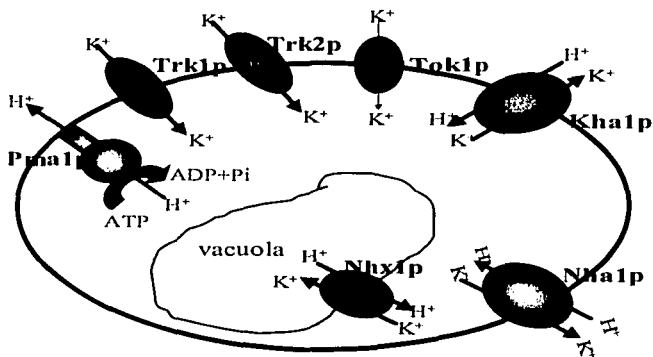


Figura 1. Modelo celular del transporte de potasio en *Saccharomyces cerevisiae*. En este modelo se muestran algunas de las proteínas de la membrana plasmática relacionadas con el transporte de potasio y la regulación del pH intracelular.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

JUSTIFICACIÓN.

Dentro de la subdivisión *Ascomycotina*, *S. cerevisiae* es la levadura más estudiada; se tiene la secuencia de todo su genoma, y hay una gran cantidad de información sobre su fisiología celular, metabolismo, biología molecular y relaciones filogenéticas. Es por tanto un excelente modelo biológico, tanto para investigaciones de ciencia básica como biotecnológicas.

Trabajos previos han demostrado que el transporte de entrada del ion potasio en *S. cerevisiae* es mediado por dos transportadores, uno de alta afinidad (Trk1p) y otro de baja afinidad (Trk2p). En nuestro laboratorio se ha propuesto que también hay un sistema de salida de este ion, mediada por un antiportador H^+/K^+ , denominado Kha1p.

Considerando que el pH intracelular debe de ser finamente regulado y que el ion potasio participa en el control del volumen celular, la turgencia, la fuerza iónica y la osmótica, consideramos que el estudio más detallado de las interacciones de estos sistemas de entrada y salida de potasio ayudará a entender mejor los mecanismos de regulación del pH intracelular así como la homeostasis del potasio.

OBJETIVOS.

Objetivo General.

Caracterizar el papel de las proteínas Trk1p, Trk2p y Kha1p, en los mecanismos de entrada y salida del ion potasio, así como su importancia en la regulación del pH interno de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*.

Objetivos Específicos.

Obtener mutantes simples con ablaciones de los genes *KHA1*, *TRK1*, *TRK2* y caracterizarlas fisiológicamente.

Obtener mutantes con ablaciones dobles de las combinaciones posibles entre estos genes y caracterizarlas.

Obtener una mutante con ablación de los tres genes y caracterizarla fisiológicamente.

MATERIALES Y METODOS.

Cepas.

Para este trabajo empleamos la cepa FY833 (MATa kan^s, leu⁻, lys⁻, his⁻, trp⁻,ura⁻) de *S. cerevisiae*, donada por la Dra. Mónica Montero de la Universidad Federal de Río de Janeiro, Brasil.

Medios de cultivo.

Medio Rico: YPD, compuesto de peptona de gelatina 1%, extracto de levadura 1%, glucosa 2%, para el medio líquido y la misma composición más Agar al 2% para el medio sólido.

Medio Selectivo: SD, compuesto por base nitrogenada, sales minerales y glucosa. Este medio se complementa con aminoácidos (histidina, leucina, lisina, triptofano) dependiendo de los marcadores auxotróficos, la fórmula del medio es: YNB (DIFCO) 0.67 %, glucosa 2 %, aminoácidos 50 mg/L, más agar 2% (medio sólido).

Los medios de cultivo, se esterilizaron por 15min a 121 °C con una presión de 1Kg/cm².

Reactivos Concentrados.

Amortiguador MES-TEA 200 mM, pH 6.0 (ácido 2-[N-Morfolino]etano sulfónico, ajustado al pH con trietanolamina); glucosa 1 M; KCl (Cloruro de potasio) 2 M; CaCl₂ 10 mM; CTAB (Cetiltrimetilamonio, bromuro) 2 mM; púrpura de bromocresol (indicador de pH) 4 µg/ml; HCl 1 N; ácido propiónico 50 %; NH₄OH (hidróxido de amonio) 2 N; piranina 100 mM; CCCP (Carbonilcianuro *m*-clorofenilhidrazona) 10 mM; DiSC₃(3) (3,3'-dipropilíacarboxianina) 0.5 mM.

Obtención de las mutantes:

Construcción de Módulos Recombinantes: marcadores de auxotrofia de *TRP1*, *HIS5⁺* y *KAN^R*.

La construcción de los módulos recombinantes está basada en los resultados publicados por Longtine, M. *et al.*, 1998. En este trabajo se describe un conjunto de plásmidos que sirven de templado para amplificar por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), los módulos de los genes *TRP1*, *HIS5⁺*, y *KAN^R*, a los que se les puede agregar en los extremos, secuencias homólogas para los genes que se desea eliminar. Una ventaja adicional de estos módulos es que, con excepción del módulo para *TRP1* que es de *S. cerevisiae*, los otros dos son genes ortólogos, *HIS5⁺* de *Schizosaccharomyces pombe* y *KAN^R* de *Escherichia coli*, con los que se elimina la posibilidad de recombinación con ellos mismos y no con la región que se desea eliminar. Adicionalmente estos módulos contienen una secuencia de 20 pb en sus extremos que permite amplificar cualquiera de ellos.

Para amplificar cada uno de los módulos, se diseñaron oligonucleótidos de 60 pb, que contenían en su extremo 5' una secuencia de 40 pb correspondiente al extremo 5' del gene blanco que sería eliminado, más 20 pb de la secuencia de los módulos (oligonucleótidos "F"). De igual manera se diseñaron oligonucleótidos en la secuencia complementaria (extremo 3') del gene que se desea eliminar (oligonucleótidos "R"). Ver tabla 1. Con estos oligonucleótidos se realizaron reacciones de PCR para amplificar cada uno de los módulos recombinantes.

Oligonucleótido	Secuencia del gene	Secuencia del módulo
FTRK1	5'-CATTTTACTTAAAAGTATTACCCTTTTFTTGATAACTAACA	CGGATCCC'CGGGTTAATTAAC-3'
RTRK1	5'-FTGAGTACGAAAAACCTATTTCTAAAAGAATGAGTATATATG	GAATTCGAGCTCGTTAAAC-3'
FTRK2	5'-TGTACTATTCACCGACGATAAGAGGGTGTAAGAAC'CAC'TC	CGGATCCC'CGGGTTAATTAAC-3'
RTRK2	5'-AGATAATACATATAATACTGAGTGA AAAATTACGTTGC'GTC	GAATTCGAGCTCGTTAAAC-3'
FKHA1	5'-ATGGCAAACAC'GTGAGGACGAATTC'GTGCGGTGFAAATC	CGGATCCC'CGGGTTAATTAAC-3'
RKHA1	5'-AAAATTAAGAACAAAAGAAAAT'AAAAAAATTC'TGCTGATAC	GAATTCGAGCTCGTTAAAC-3'

Tabla 1. Secuencias de los diferentes oligonucleótidos "F" y "R" de 60nt de longitud, que fueron diseñados para construir los módulos recombinantes, de los genes *TRK1*, *TRK2* y *KHA1*.

PCR para la construcción de los módulos recombinantes.

Con los oligonucleótidos de la tabla 1, se amplificaron por PCR los módulos correspondientes utilizando el Kit Expand High Fidelity PCR system de ROCHE[®], y un termociclador COY II. Para la mezcla de reacción se utilizaron los reactivos del Kit, mezcla de dNTPs 10 mM, oligonucleótidos (R y F) 200 nmoles/ μ l y DNA de los plásmidos con los módulos (100 ng), con el siguiente programa: un ciclo de desnaturalización durante 10 minutos a 94° C, seguido de 25 ciclos (desnaturalización por 30 segundos a 94 °C, alineamiento por 45 segundos a 55 °C y extensión por 2 minutos a 72 °C). Terminando con un ciclo de 5 minutos a 72 °C. Este programa solo se modificó cuando el producto esperado superó las 1500 pb y solo en la cantidad de ciclos, de 25 a 30.

Los productos de PCR que se obtuvieron, se verificaron en un gel de agarosa al 1% y se purificaron empleando el Kit QIAGEN[®] PCR purification. El DNA purificado se concentró en un SPEED-VAC[®] (cámara centrífuga de vacío).

TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

Construcción de las mutantes.

Preparación de células competentes y transformación.

Para obtener las células competentes, se inoculó un matraz con 10 ml de medio YPD, que fue incubado por 18 h a 30 °C con agitación constante (250 rpm). Se tomó una alícuota del cultivo y se determinó la densidad óptica a 600 nm en un espectrofotómetro *Shimadzu*, modelo UV-160A. Con este cultivo se inoculó un matraz con 50 ml del mismo medio a una densidad óptica de 0.45 U a 600 nm y se incubó a 30° C con agitación constante, hasta que la densidad óptica fuera de 0.5 a 0.6 U a 600 nm. Posteriormente las células se lavaron con 50 ml de agua destilada estéril, se resuspendieron en un ml de agua destilada estéril, se transfirieron a tubo de 1.5 ml y se centrifugaron por 10 seg. El paquete celular se lavó con un ml de acetato de litio 100mM, TE (Tris 10 mM - EDTA 1 mM a un pH 7.5), se centrifugó y finalmente el paquete celular se resuspendió en 500 µl de la mezcla de acetato de litio + TE.

Para la transformación, se colocaron en un tubo de 1.5 ml, 5 µl de DNA de esperma de salmón (10mg/ml), 15 µl del módulo recombinante (de 5 a 10 µg) y 50 µl de las células competentes. A esta mezcla se agregaron 300 µl de acetato de litio, TE (ambos en igual concentración que el paso anterior) más polietilenglicol al 50 %; la mezcla total se incubó por 30min a 30° C. Posteriormente se agregaron 40 µl de dimetilsulfóxido y se incubó a 42 °C durante 15 min. Las células transformadas se centrifugaron y resuspendieron en 500 µl de agua destilada estéril. Finalmente, se inocularon cajas con medio (selectivo dependiendo del módulo empleado) con una alícuota de 100 µl de células transformadas y se incubaron a 30 °C hasta que aparecieron colonias (de tres a cuatro días).

Verificación preliminar de las mutantes.

Mutante simple: $\Delta kha1$.

Para la construcción de esta mutante y todas las demás, se utilizó la cepa FY833 (MATA kan^R, leu⁻, lys⁻, his⁻, trp⁻, ura⁻). La cepa silvestre FY833 se transformó empleando los módulos de *TRP1* e *HIS5⁺*, ambas ablaciones ($\Delta Kha1::TRP1$ y $\Delta Kha1::HIS5⁺$), se seleccionaron en cajas SD-trp⁻ y SD-his⁻, respectivamente.

Mutante simple: $\Delta trk1$.

La ablación de este gene se hizo en el mismo fondo genético con los módulos *TRP1*, *HIS5⁺* y *KAN^R*. Las dos primeras mutantes ($\Delta Trk1::TRP1$ y $\Delta Trk1::HIS5⁺$) se seleccionaron en cajas con medio selectivo SD-Trp⁻ y SD-His⁻ respectivamente, mientras que la mutante $\Delta Trk1::KAN^R$ se seleccionó con cajas de medio rico YPD mas 400mg/L de genéticina.

Mutante simple: $\Delta trk2$.

La mutante de este gene, sólo se hizo para el módulo de *HIS5⁺* (mutante $\Delta Trk2::HIS5⁺$), siendo seleccionada en medio selectivo SD-His⁻.

Mutante doble: $\Delta trk1-\Delta kha1$.

Para esta mutante, se utilizó la cepa $\Delta Trk1::KAN^R$, utilizando el módulo *HIS5⁺* para eliminar el gene de *KHA1*. Esta nueva mutante ($\Delta Trk1::KAN^R-\Delta Kha1::HIS5⁺$), se seleccionó en SD-His⁻. También se realizó la construcción de la mutante doble empleando como fondo genético la mutante simple de $\Delta Trk1::HIS5⁺$ y el módulo de *TRP1*, para eliminar el gene de *KHA1*; esta mutante ($\Delta Trk1::HIS5⁺-\Delta Kha1::TRP1$) se seleccionó en SD-Trp.

Mutante doble: $\Delta trk1-\Delta trk2$.

En el fondo genético de la mutante simple $\Delta Trk1::KAN^R$, se eliminó el gen de *TRK2*, utilizando el módulo *TRP1*. Esta mutante doble $\Delta Trk1::KAN^R-\Delta Trk2::TRP1$, fue seleccionada en SD-Trp⁻ + 100mM de KCl.

Mutante doble: $\Delta trk2-\Delta khal$.

Las cepas $\Delta Khal::TRP1$ y $\Delta Khal::HIS5^+$ se transformaron con los módulos *TRP1* e *HIS5⁺* de forma combinada para tener una misma mutante con diferentes marcadores de auxotrofia. Las dobles mutantes fueron seleccionadas en cajas SD-His⁻ y SD-Trp⁻.

Mutante triple: $\Delta Trk1-\Delta Trk2-\Delta Khal$.

Esta mutante se obtuvo a partir de la cepa $\Delta Trk1::KAN^R-\Delta Khal::HIS5^+$, a la que se transformó con el módulo *TRP1* para el gen *TRK2* y se seleccionó en cajas SD-Trp⁻ + 100 mM de KCl.

Extracción de DNA total.

De las colonias estriadas en la caja de Petri con medio YPD, se colectó un pellet de células que se resuspendió en 50 μ l de agua destilada estéril. A esta suspensión se agregó, 200 μ l de solución de lisis (2% de tritón X-100, 1% SDS, 100mM de NaCl, 10mM Tris-Cl (pH 8) y 1 mM de Na₂EDTA). Posteriormente, se agregaron 200 μ l de una mezcla de Fenol:Cloroformo:alcohol isoamílico (en proporción 25:24:1) y perlas de vidrio de 0.5 mm de diámetro (previamente lavadas en HCl). La suspensión se agitó en el vortex durante 4 min a temperatura ambiente. Posteriormente se agregaron 200 μ l de TE (Tris 25mM y EDTA 1mM a pH 8.0) y se centrifugó durante 5min en una microfuga.

En un tubo limpio, se colectó la fase acuosa, a la que se agregó 1 ml de etanol absoluto frío (-20° C); la mezcla se homogenizó suavemente por inversión y se centrifugó nuevamente por 2 min. El sobrenadante se desechó y al precipitado se agregaron 400 µl de TE más 10 µl de RNAasa (10 mg/ml), incubando nuevamente a 37 °C por 15 min. A la mezcla se le agregaron 10 µl de acetato de amonio 4M más 1ml de alcohol absoluto frío (-20 °C). Se homogenizó suavemente y se centrifugó por 2 min a la velocidad máxima de la microcentrifuga. El DNA ya purificado se resuspendió en 50µl de agua destilada estéril.

Comprobación genética de las mutantes construidas.

Las mutantes obtenidas se verificaron por PCR, utilizando el siguiente programa: un ciclo de desnaturalización durante 10 minutos a 94 °C, seguido de 25 ciclos (desnaturalización por 30 segundos a 94 °C, alineamiento por 45 segundos a 55 °C y extensión por 2 minutos a 72 °C). Terminando con un ciclo de 5 minutos a 72 °C. Este programa sólo se modificó cuando el producto esperado superó las 1500 pb y sólo en la cantidad de ciclos, de 25 a 30.

Para verificar la presencia de los módulos, utilizamos cualquiera de los oligonucleótidos F y R descritos en la tabla 1, ya que todos los módulos contienen los mismos 20 pb en el extremo 5' así como en el 3'. Para comprobar las ablaciones, se diseñaron oligonucleótidos específicos de aproximadamente 20 pb para cada una de las regiones codificantes de los genes *TRK1*, *TRK2* y *KHA1* La secuencia de cada oligonucleótido que se utilizó en este PCR, se muestran en la tabla 2.

Tipo de oligonucleótido	Secuencia de oligonucleótidos	Tamaño del producto de PCR
Forward TRK1	5'-CGGGATCCAGATGTGGAGTCTGGACCAGG-3'	700pb
Reverse TRK1	5'-GGACTAGTTGGTGTGATATGCAGCATACG-3'	
Forward TRK2	5'-AGAAGACCCACGACAATCC-3'	603pb
Reverse TRK2	5'-CTCATCTCCCTCATCAACAAAAG-3'	
Forward KIA1	5'-TTAGCCAGTCATGCTCAG-3'	800pb
Reverse KIA1	5'-CTTCCAAAGCAAGAATACAA-3'	

Tabla 2. Secuencia de oligonucleótidos para comprobar la ablación de los genes *TRK1*, *TRK2* y *KIA1*. Los diferentes oligonucleótidos se diseñaron por un programa especial, eligiéndose sólo aquellos que presentaban una T_m baja.

Caracterización fisiológica de las mutantes.

Creclimiento celular.

De cada mutante, se inoculó un matraz con 10 ml de medio YPD y se incubó toda la noche a 30 °C con agitación constante. Se diluyó 100 veces una alícuota de 100 μ l de cada cultivo y se determinó el número de células con un hemocitómetro de Neubauer. Con estos cultivos se inocularon matraces con 50,000 células/ml, que se incubaron por 18 h a 30 °C con agitación constante. Las células obtenidas se lavaron dos veces con agua destilada y se resuspendieron a razón de 0.5 g/ml en agua destilada (células no ayunadas). O bien se resuspendieron 0.1 g/ml de agua destilada, se incubaron por 15 h a 30 °C con agitación constante, se lavaron dos veces y se resuspendieron finalmente a 0.5 g/ml en agua destilada (células ayunadas).

Determinación de potasio intracelular.

El contenido de potasio se midió en las células ayunadas y sin ayunar. A 50 mg de células (100 μ l) se les agregaron 900 μ l de CTAB 200 μ M y se incubaron por 15 minutos; posteriormente se centrifugaron 30 segundos a (14,000 rpm). El sobrenadante se diluyó 1:10 con agua desionizada y se determinó el contenido de potasio en un fotómetro de flama

Carl Zeiss PF5 37177, calibrado a 0 con agua desionizada y a 100 con una solución 1 mM de KCl.

Medida del transporte de potasio.

Los cambios en la concentración extracelular de potasio se siguieron con un electrodo de valinomicina selectivo para este catión, conectado a un potenciómetro Selection 2000 Beckman, acoplado a un sistema de registro (computadora) elaborado por los Ings. Wilfredo Martínez Payán, Ignacio Martínez, Manuel Ortines y Aurey Galván. En la cubeta del instrumento se agregan 10 ml de amortiguador MES-TEA 2 mM, pH 6.0 y se registra la línea base por un minuto, se agregan 125 mg de células y se continúa el registro por 3 minutos más. Finalmente se agrega glucosa 50 mM y se continúa el registro por 15 minutos. Los trazos se calibran con una solución de KCl, agregando alícuotas de $10\mu\text{M}$, a un medio sin células, con amortiguador MES-TEA pH 6.0, 2 mM, en un volumen total de 10 ml. Se estimó el transporte de K^+ también a diferente pH, empleando el amortiguador ácido tartárico-TEA para pH 4.0 y bicina-TEA para pH 8.0.

Determinación del bombeo de protones

Utilizando un electrodo de pH.

El bombeo de protones se cuantificó mediante el empleo de un electrodo de pH. En una cámara con temperatura controlado ($30\text{ }^\circ\text{C}$), se registraron los cambios en la concentración de H^+ extracelulares, mediante un electrodo compuesto, conectado a un potenciómetro Selection 2000 Beckman, acoplado a un sistema de registro (computadora) elaborado por los Ings. Wilfredo Martínez Payán, Ignacio Martínez, Manuel Ortines y Aurey Galván. En la cubeta del instrumento se agregan 10 ml de amortiguador MES-TEA 2 mM, pH 6.0,

registrando una línea base de un minuto, posteriormente se agregan 125 mg de células y se continúa el registro por 3 minutos más. Finalmente se agrega glucosa 50 mM y se continúa el registro por 15 minutos. Los trazos se calibran con una solución de HCl, agregando alícuotas de 0.25 μ Eq a un medio sin células con amortiguador MES-TEA pH 6.0, 2 mM, en un volumen total de 10 ml. Se estimó el bombeo de H^+ también a diferente pH, empleando el amortiguador ácido tartárico-TEA para pH 4.0 y bicina-TEA para pH 8.0.

Empleando Púrpura de bromocresol.

El bombeo de protones se determinó por los cambios en absorbencia del púrpura bromocresol. En una celda de 3 ml se colocan 50 μ l de células (25 mg de levaduras) amortiguador MES-TEA pH 6.0, 2 mM, más el indicador de pH, el púrpura de bromocresol (4 μ g/ml de concentración final) para un volumen final de 2 ml. Los cambios en absorbencia se siguen a 494-587 nm en un espectrofotómetro de doble longitud de onda (DW2, Olis conversion). Después de registrar la línea base se adicionan 100 μ l de glucosa 1 M (50 mM de concentración final) para energizar las levaduras. Posteriormente se agregan 50 μ l de KCl (50 mM) y se continúa el registro. Al finalizar cada lote de experimentos, se obtiene una curva de titulación, agregando concentraciones crecientes de HCl 1 N. Se estimó el bombeo de H^+ también a diferente pH, empleando el amortiguador ácido tartárico-TEA para pH 4.0 y bicina-TEA para pH 8.0.

Cambios del pH intracelular.

Se electroporan con piranina células ayunadas de cada cepa, siguiendo el siguiente protocolo: 500 μ l de células (250 mg de levaduras) más 20 μ l de piranina (pK 7.2) 100 mM se colocan en una celda para electroporar de 0.4 mm, aplicando un pulso de 2 KV, 25 μ F y

200 Ω (con un pulsador Bio-Rad gene). Posteriormente se lava tres veces con H₂O dd, centrifugando (20 seg a 14,000 rpm) y descartando el sobrenadante. Al final de los lavados se resuspende el paquete celular en su volumen inicial con H₂O dd. De estas células se colocan 50 μ l (25 mg de levaduras) en una celda que contiene amortiguador MES-TEA pH 6.0, 2 mM, para un volumen final de 2 ml; se inicia el trazo con la adición de las células. Pasados 60 seg se agregan 100 μ l de glucosa (50 mM) y 2 min después se agregan 50 μ l de KCl (50 mM). Se estimó el pH intracelular también a diferente pH, empleando el amortiguador ácido tartárico-TEA para pH 4.0 y bicina-TEA para pH 8.0.

Al terminar cada trazo, se obtuvo el valor de la fluorescencia máxima, agregando 50 μ l de hidróxido de amonio (NH₄OH 2 N), y para el valor de fluorescencia mínima se agregaron 50 μ l de ácido propiónico al 50%. Ambos valores se emplearon para realizar el cálculo del pH intracelular con la ecuación de Henderson-Hasselbalch y las correcciones adecuadas.

Estimación del potencial de membrana.

El potencial de membrana se estimó empleando la 3,3'-dipropiltiacarbocianina (DiSC₃(3)), que se distribuye siguiendo la formación del potencial de membrana. Los cambios en la fluorescencia de este compuesto se siguieron a 540 nm de excitación y 590 nm de emisión en un espectrofluorómetro SLA Aminco MDX1000. En una celda del fluorómetro, se agregó: CCCP, 10 μ M, CaCl₂, 100 μ M, glucosa, 50mM, amortiguador MES-TEA pH 6.0, 2 mM para un volumen final de 2ml y 50 μ l de células (25 mg de levaduras), dejando transcurrir dos minutos. Pasados los dos minutos de incubación se agrega la cianina (DiSC₃(3), 0.25 μ M), y posteriormente se agrega 50 mM de KCl para observar el abatimiento del potencial de membrana formado inicialmente para cada

mutante. Se estimó el potencial de membrana también a diferente pH, empleando el amortiguador ácido tartárico-TEA para pH 4.0 y bicina-TEA para pH 8.0.

Cinética de Transporte de $^{86}\text{Rb}^+$.

Las células se incubaron en un amortiguador determinado (MES-TEA pH 6.0, ácido tartárico-TEA pH 4.0 ó bicina-TEA pH 8.0 a 10mM) más 50mM de glucosa, durante 3min. Finalizado este tiempo, se agregaron diferentes concentraciones de Rb^+ (de 0.1mM a 10mM del concentrado frío/caliente); incubando durante otros 3 min para después filtrar en filtros milipore de nitrocelulosa con 45 μm de diámetro del poro; lavando cada filtro con 10 ml de KCl 100 mM.

Los filtros se disolvieron en líquido de centelleo durante 12 hr para conocer cuanta radioactividad se transportó a esa determinada concentración de Rb^+ ; por tanto se empleó un contador de centelleo modelo LS6500 de Beakmann.

RESULTADOS.

Construcción de los módulos recombinantes.

Se construyeron los módulos *KAN^R*, *HIS5⁺* y *TRP1*, con extremos homólogos de los genes *TRK1*, *TRK2* y *KHA1* (Figura 2). La amplificación de los módulos se realizó con el empleo de los oligonucleótidos de la tabla 2, que reconocen una región complementaria constante del plásmido. El tamaño de los módulos se presenta en la tabla 3.

Plásmido	Tamaño del producto de PCR
pBM31 (<i>KAN^R</i>)	1559pb
pBM32 (<i>TRP1</i>)	1036pb
pBM33 (<i>HIS5⁺</i>)	1403pb

Tabla 3. En esta tabla sólo se dan los pesos respectivos de los diferentes productos de PCR de los tres diferentes plásmidos utilizados.

Con estos módulos recombinantes se transformaron las células FY833. En la figura 2 se muestra un esquema de la estructura general de los módulos, así como su integración por recombinación homóloga al genoma de la levadura.

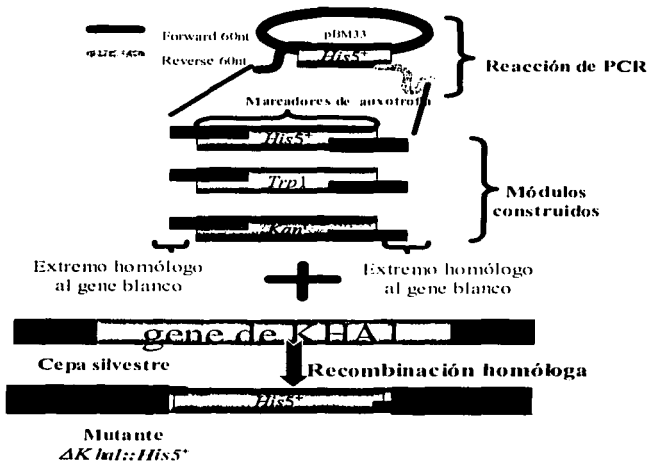


Figura 2. Construcción de Módulos recombinantes, se muestra de forma esquematizada la construcción de un módulo recombinante, que se emplea para eliminar el gene KHA1. En la parte superior se representa el plásmido pBM33 junto con los oligonucleótidos R y F de 60 pb, con extremo complementario al gene de KHA1. Después de una reacción de PCR, se obtiene la construcción del módulo; mismo que se introduce a células competentes y por medio de recombinación homóloga se ablastiona el gene deseado.

Verificación de los genotipos

Las colonias seleccionadas de cada transformación se crecieron en cajas con los marcadores correspondientes de auxotrofia, obteniendo de esta manera una preverificación del genotipo, ya que sólo crecieron las colonias que contenían dentro de su genoma el gene adecuado para sobrevivir frente a la ausencia del nutrimento o la presencia del antibiótico. De forma simultánea se verificó la viabilidad de las ablaciones de los genes TRK1, TRK2 y KHA1. Por tanto se obtuvieron tres construcciones de la mutante $\Delta trk1$, dos construcciones

de las mutantes $\Delta kha1$, $\Delta trk1-\Delta kha1$ y $\Delta kha1-\Delta trk2$; y sólo una construcción de las mutantes $\Delta trk2$, $\Delta trk1-\Delta trk2$ y $\Delta trk1-\Delta kha1-\Delta trk2$ (Tabla 4).

Cepa mutante	Viabilidad de las mutantes
$\Delta trk1::TRP1$	Viable
$\Delta trk1::HIS5^+$	Viable
$\Delta trk1::KAN^R$	Viable
$\Delta trk2::HIS5^+$	Viable
$\Delta kha1::TRP1$	Viable
$\Delta kha1::HIS5^+$	Viable
$\Delta trk1::KAN^R-\Delta trk2::TRP1$	Viable
$\Delta trk1::HIS5^+-\Delta kha1::TRP1$	Viable
$\Delta trk1::KAN^R-\Delta kha1::HIS5^+$	Viable
$\Delta kha1::TRP1-\Delta trk2::HIS5^+$	Viable
$\Delta kha1::HIS5^+-\Delta trk2::TRP1$	Viable
$\Delta trk1::KAN^R-\Delta kha1::HIS5^+-\Delta trk2::TRP1$	Viable

Tabla 4. Lista de mutantes construidas en este trabajo, así como la viabilidad de la construcción de la mutante.

Las doce cepas anteriores se sembraron en cajas con medio YPD para extraer el DNA total y realizar las reacciones de PCR, para verificar que estas cepas seleccionadas tuvieran los productos de PCR correspondientes de la región codificante de los genes eliminados, así como del módulo empleado.

Con los oligonucleótidos específicos que se diseñaron para amplificar un fragmento de la región codificante de cada uno de los genes, se hicieron las reacciones de PCR para cada una de las cepas y se corrieron en un gel de electroforesis en agarosa al 1%, con un amortiguador TBE 1X a 50 mV durante 3 hr (Figura 3).

Los productos de PCR amplificados del DNA de la cepa silvestre Fy833 son: un producto de 800 pb, que corresponde a la presencia del gene *KHA*; un segundo producto de 700 pb que corresponde al gene de *TRK1* y un tercer producto de un tamaño de 603 pb que

corresponde al gene de *TRK2*. No hubo amplificación de ningún módulo (Figura 3, Carril A).

A partir del DNA genómico de la cepa mutante $\Delta trk1::KAN^R$ (Figura 3, Carril B), sólo se amplifican los fragmentos del gene *KHA1* de 800 pb y *TRK2* de 603 pb, así como un producto que corresponde al módulo de *KAN^R* de 1500 pb.

Para la mutante $\Delta trk2::HIS5^+$ (Figura 3, carril C) se amplificaron los fragmentos de *KHA1* de 800 pb, el de *TRK1* de 700 pb, y el módulo de 1403 pb, que corresponde a *HIS5⁺*.

En la mutante $\Delta kha1::TRP1$, se amplifican los fragmentos de 700 y 603 pb de los genes *TRK1* y *TRK2*, así como el módulo de *TRP1* de 1036 pb (Figura 3, carril D).

En la mutante doble $\Delta trk1::KAN^R-\Delta kha1::HIS5^+$, sólo se amplifica el fragmento de *TRK2* de 603 pb y dos amplificadas, que corresponden a los módulos *KAN^R* e *HIS5⁺* (Figura 3, carril E).

En la mutante doble $\Delta kha1::TRP1-\Delta trk2::HIS5^+$, se amplificó el fragmento de gene *TRK1* de 700 pb, así como dos módulos, el que corresponde a *TRP1* e *HIS5⁺* (Figura 3, carril F).

En la mutante $\Delta trk1::KAN^R-\Delta trk2::TRP1$, se amplificó el fragmento de 800 pb que corresponde al gene *KHA1* y el de los dos módulos *KAN^R* y *TRP1* (Figura 3, carril G).

En la mutante triple $\Delta trk1::KAN^R-\Delta kha1::HIS5^+-\Delta trk2::TRP1$, sólo se amplificaron los tres módulos que son *KAN^R* de 1559 pb, *HIS5⁺* de 1403pb y *TRP1* de 1036 pb (Figura 3, carril H).

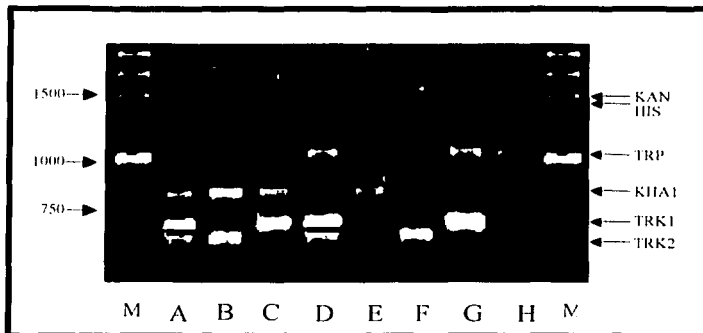


Figura 3. Electroforesis del producto de PCR de las mutantes empleadas en este estudio. El tamaño del producto de PCR para el gene de *KHA1* es de 800pb, para el gene *TRK1* es de 700pb y para el gene *TRK2* es de 603pb. El tamaño del producto de PCR para el módulo *KAN^R* es de 1559pb, para el *HIS5⁺* es de 1403pb y para *TRP1* es de 1036pb. Carril A: Fy833, B: $\Delta trk1::KAN^R$, C: $\Delta trk2::HIS5^+$, D: $\Delta kha1::TRP1$, E: $\Delta trk1::KAN^R-\Delta kha1::HIS5^+$, F: $\Delta kha1::TRP1-\Delta trk2::HIS5^+$, G: $\Delta trk1::KAN^R-\Delta trk2::TRP1$, H: $\Delta trk1::KAN^R-\Delta kha1::HIS5^+-\Delta trk2::TRP1$ y M: 250pb DNA Ladder.

De cada una de las mutantes obtenidas, se tomó una muestra del cultivo y se les colocó en glicerol para conservarlas a -70°C , dentro de un criotubo.

Caracterización fisiológica de las mutantes.

Crecimiento celular.

Todas las mutantes obtenidas en este trabajo fueron viables y su rendimiento promedio fue de 1.7-1.75 g / 200 ml de medio YPD.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Determinación de potasio intracelular.

El contenido de potasio se midió en las células ayunadas y sin ayunar, mediante el empleo de detergente CTAB, técnica que se describe en materiales y métodos. Este detergente fue utilizado para romper a las células y poder medir la concentración del K^+ intracelular, ocupando un fotómetro de flama Carl Zeiss.

Para este parámetro, encontramos que en las células sin ayunar el contenido de potasio es ligeramente mayor para las cepas $\Delta trk1$ y $\Delta trk2$, en comparación con la cepa silvestre; mientras que las cepas mutantes $\Delta kha1$, $\Delta trk1-\Delta trk2$, $\Delta trk1-\Delta kha1$, $\Delta kha1-\Delta trk2$ y $\Delta trk1-\Delta kha1-\Delta trk2$ también mostraron un contenido un poco menor de potasio, en comparación con las mutantes $\Delta trk1$ y $\Delta trk2$. Las cepas mutantes que presentan ablación de los genes de *TRK1* y *KHA1* con excepción de la cepa $\Delta trk1$, presentan un mismo contenido de K^+ intracelular (Tabla 5).

Para el caso de las células ayunadas, encontramos que el contenido de potasio fue ligeramente mayor para las cepas $\Delta trk1$ y la mutante $\Delta trk1-\Delta kha1-\Delta trk2$, en comparación con la cepa silvestre y las demás mutantes; mientras que las cepas $\Delta kha1$ y $\Delta trk1-\Delta trk2$ presentan una ligera disminución de este valor máximo observado en las dos mutantes anteriores. El contenido de K^+ intracelular de las mutantes $\Delta trk1-\Delta kha1$ y $\Delta kha1-\Delta trk2$ presentan una similar concentración, patrón que se refleja en estas mismas cepas cuando no están ayunadas (Tabla 5).

En ambas condiciones la cepa silvestre presentó el contenido de K^+ una concentración menor que todas las mutantes (Tabla 5). Los cambios observados, sin embargo, son estadísticamente no significativos.

Cepa	Potasio intracelular	
	Células no ayunadas [mM]	Células ayunadas [mM]
Fy833	228.97 +/- 8.54	131.41 +/- 2.98
<i>Δtrk1::KAN^R</i>	240.50 +/- 7.47	139.53 +/- 4.63
<i>Δtrk2::HIS5⁺</i>	241.79 +/- 10.43	137.32 +/- 8.01
<i>Δkha1::TRP1</i>	233.88 +/- 9.27	138.80 +/- 9.28
<i>Δtrk1::KAN^R - Δtrk2::TRP1</i>	232.39 +/- 11.86	138.99 +/- 4.29
<i>Δtrk1::KAN^R - Δkha1::HIS5⁺</i>	235.96 +/- 9.31	135.26 +/- 3.99
<i>Δkha1::TRP1 - Δtrk2::HIS5⁺</i>	235.02 +/- 10.27	135.8 +/- 2.36
<i>Δtrk1::KAN^R - Δkha1::HIS5⁺ - Δtrk2::TRP1</i>	235.02 +/- 8.04	140.56 +/- 5.37

Tabla 5: Potasio intracelular de las distintas cepas estudiadas. Las células se crecieron en medio YPD durante 18hr y ayunadas 15hr. Se determinó dejando incubar a las células en CTAB 200 μ M durante 15 minutos; centrifugando 30 seg a velocidad máxima; se recolectó el sobrenadante y se diluyó 1:10 en H₂O dd. Las medidas se realizaron en un fotómetro de emisión de flama Carl Zeiss PF5 37177. Se presentan los valores de las concentraciones, así como su desviación estándar.

Determinación del transporte de potasio.

En los trazos de la Figura 4 a pH 6.0, se observan los cambios en la concentración extracelular de potasio, seguidos con un electrodo específico para este ion, tal y como se describe en materiales y métodos. El registro se inicia con la línea base, que corresponde a la concentración de potasio existente en el medio (7 μ M). Al minuto se agregaron las células, observando un incremento en la concentración de K⁺, debido a la salida de este catión del interior celular. Este trazo se puede seguir durante dos minutos sin que se observe ningún cambio importante. Posteriormente al adicionar glucosa al medio, se observó una disminución del potasio extracelular, lo que implica la entrada del catión a la célula. En la cepa Fy833 se observó una salida de potasio, seguida de una entrada de este catión posterior a la adición de glucosa (Figura 4a). Este trazo se utilizó para comparar con todas las cepas mutantes.

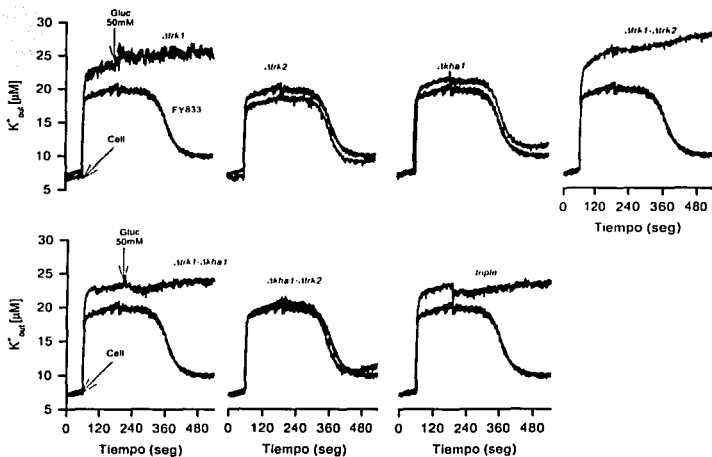


Figura 4. Transporte de potasio de las cepas Fy833 y las mutantes a pH 6.0. Las células se crecieron en medio YPD 18 hr y se ayunaron 15hr. Después de colocar el medio de cada experimento (MES-TEA 2 mM, pH 6.0) en la celda, para un volumen final de 10 ml, se inició el trazo y se agregaron 125 mg de células. Posteriormente se agregó 50 mM de glucosa, con la finalidad de energizar a las células y puedan realizar la captura o transporte de este ion. El registro del potasio presente en el medio se detectó mediante un electrómetro específico para este catión.

Las diferencias importantes son las siguientes:

- La falta de Trk1p ocasionó una mayor salida inicial de K^+ al medio extracelular, así como también se evitó la recuperación de este ión después de ser energizadas las células tanto de las mutantes simple, dobles o triple.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

- La ausencia de Trk2p no afectó ostensiblemente el comportamiento de las cepas en que se eliminó, independientemente de si esto se hizo en forma simple o en combinación con otros genes.
- La ausencia de Kha1p tampoco parece modificar el comportamiento de las células en que se elimina, ya sea solo o en combinación con otros transportadores.

Dado que en particular, Kha1p es un intercambiador de catión (K^+) por protón, se esperaría que a un pH bajo pudiera mostrar un mejor funcionamiento; en la figura 5 se muestra el transporte de K^+ , medido a pH 4.0. Bajo esta condición, en la cepa Fy833 se observó una salida de potasio (de alrededor de 17 μM), seguida de una lenta entrada de este catión posterior a la adición de glucosa (Figura 5a); a diferencia de la salida registrada a pH 6.0, donde fue de alrededor de 35 μM (Figura 4a); este trazo se utilizó para comparar con todas las cepas mutantes.

En la Figura 5a, observamos que las células de la cepa *Δtrk1*, después de ser agregadas al medio amortiguador, presentaron una salida de K^+ , ligeramente mayor que el de las células de la cepa silvestre; pero al agregar glucosa, no recuperaron el K^+ que salió inicialmente, además de esta salida inicial de potasio al medio, las células presentan una salida lenta de K^+ al medio extracelular.

Los resultados de la Figura se pueden resumir como sigue:

- En la cepa silvestre, en contra de lo esperado, la salida del K^+ a este valor del pH fue menor que a pH 6.0. Dado que la actividad de la H^+ -ATPasa a este valor del pH es menor (Peña *et al.*, 1972), la velocidad del transporte del K^+ también fue menor.

- La ausencia de Trk1p ocasionó en todos los casos en que se eliminó, en la desaparición de la entrada del K^+ .

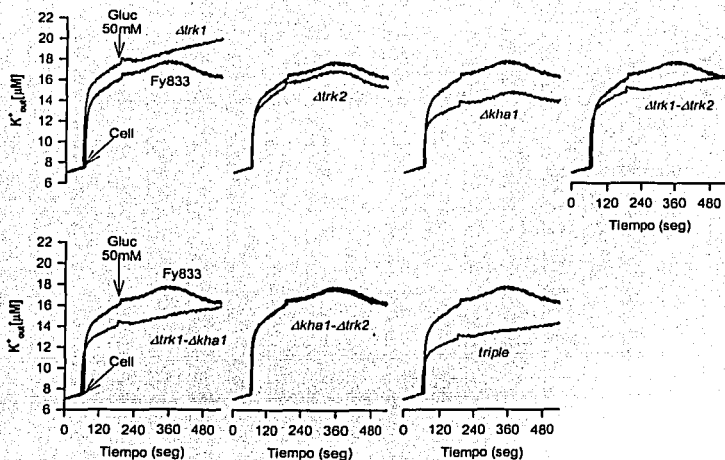


Figura 5. Transporte de potasio de las cepas Fy833 y las mutantes a pH 4.0. Las células se crecieron en medio YPD 18 hr y se ayunaron 15 hr. Después de colocar el medio de cada experimento (ácido tartárico-TEA 2 mM, pH 4.0), para un volumen final de 10 ml, se inició el trazo y se agregaron 125 mg de células. Posteriormente se agregó 50 mM de glucosa para energizar las células. El potasio presente se detectó mediante un electrómetro específico para este catión.

- La ausencia de Trk2p no produjo cambios importantes respecto a las cepas respectivas en que se le eliminó.

- La ausencia de Kha1p se tradujo en una menor salida inicial del K^+ en todos los casos, al comparar cada mutante con lo que sería su control respectivo.

Dadas algunas de las diferencias encontradas a los otros valores de pH, se decidió estudiar el transporte también a pH 8.0. Los resultados se pueden resumir como sigue:

- A pH 8.0, la cepa silvestre presentó una salida de alrededor de 30 μM de K^+ , valor semejante al observado a pH 6.0, y la adición de glucosa produjo su transporte de forma mucho más rápida al interior celular, en comparación con lo observado a pH 6.0, y desde luego, a pH 4.0. Además, las células capturaron todo el K^+ que salió inicialmente, al ser agregadas las células (Figura 6 a).
- La ausencia de Trk1p se tradujo en una disminución sustancial del transporte, y en una salida.
- La ausencia de Trk2p no se tradujo en ningún cambio ostensible respecto de la cepa silvestre o de las otras mutantes en los casos en que se eliminó en forma adicional.
- La eliminación de Kha1p tampoco produjo ningún cambio significativo, ya fuera eliminado de la cepa silvestre o de las distintas mutantes de Trk1p, Trk2p, o de ambos transportadores.

Con objeto de estudiar el transporte en condiciones favorables para la entrada y cierta acumulación del potasio dentro de las células, se agregó al medio extracelular 100 μM de KCl.

A pH de 6.0, como en la ausencia de K^+ añadido, la cepa silvestre mostró transporte de K^+ aproximadamente a los 2 min después de la adición de glucosa al medio, transportando hacia el interior alrededor de 20 μ mol de K^+ extracelular (Figura 7a). En cuanto a las mutantes, de nuevo parece repetirse el patrón ya descrito en los experimentos sin la adición

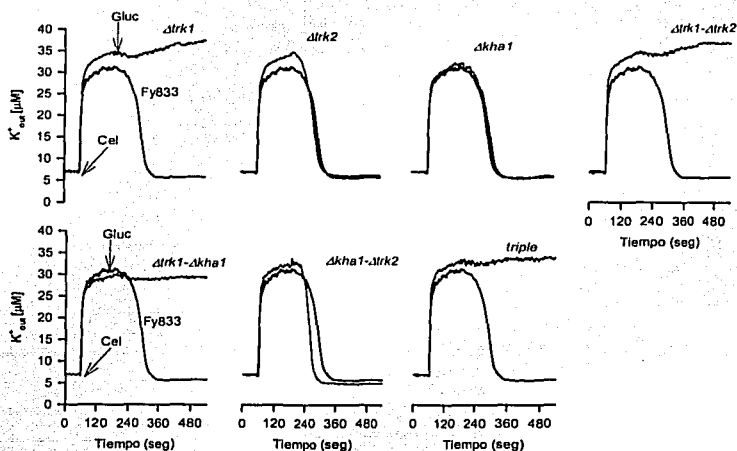


Figura 6. Transporte de potasio de las cepas Fy833 y las mutantes a pH 8.0. Las células se crecieron en medio YPD 18 hr y se ayunaron 15 hr. Después de colocar el medio de cada experimento (bicina-TEA 2 mM, pH 8.0) en la cubeta, para un volumen final de 10 ml, se inició el trazo y se agregaron 125 mg de células. Posteriormente se agregó 50 mM de glucosa, con la finalidad de energizar las células. El potasio se detectó mediante un electrodo específico para este catión.

de K^+ ; si se comparan las mutantes individuales de $Trk1p$, $Trk2p$ y $Kha1p$ con sus respectivos controles con el gene, se observó los siguiente:

- No se observó transporte alguno en las cepas carentes del $Trk1p$.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

- La ausencia de Trk2p no modificó sustancialmente el transporte observado.
- La ausencia de Kha1p tampoco modificó el transporte

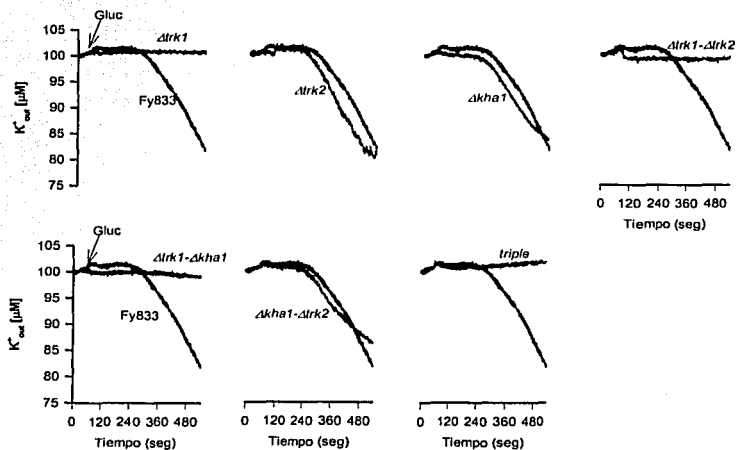


Figura 7. Transporte de potasio de las cepas Fy833 y las mutantes a pH 6.0. Las células se crecieron en medio YPD 18 hr y se ayunaron 15 hr. Después de colocar el medio de cada experimento (MES-TEA 2 mM, pH 6.0; más 100 μM de KCl), para un volumen final de 10 ml, se inició el trazo y se agregaron 125 mg de células. Posteriormente se agregó 50 mM de glucosa con la finalidad de energizar las células. El potasio presente se detectó mediante un electrómetro específico para este catión.

Los experimentos con la adición de 100 μM de K^+ se repitieron también a los pHs de 4.0 y 8.0, y los resultados son semejantes (Figs. 8 y 9); es decir, en general, sólo desaparece

el transporte en ausencia de Trk1p, y la ablación de Trk2p y/o Kha1p no parecen modificar el fenotipo en cuanto a este parámetro.

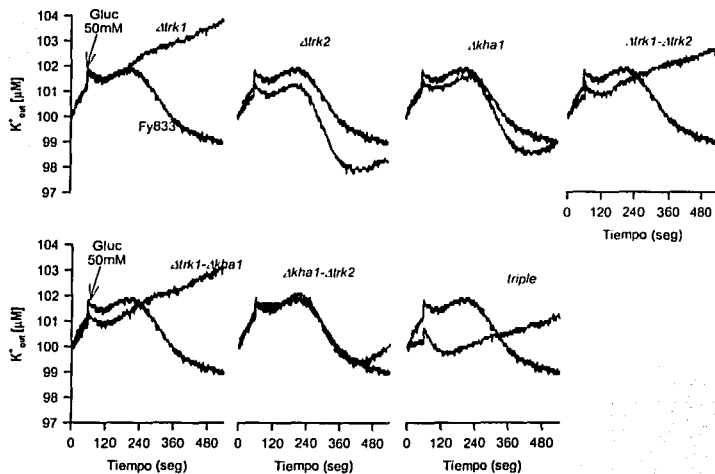


Figura 8. Transporte de potasio de las cepas Fy833 y las mutantes a pH 4.0. Las células se crecieron en medio YPD 18 hr y se ayunaron 15 hr. Después de colocar el medio de cada experimento (ácido tartárico-TEA 2 mM, pH 4.0; más 100 μ M de KCl), para un volumen final de 10 ml, se inició el trazo y se agregaron 125 mg de células. Posteriormente se agregó 50 mM de glucosa con la finalidad de energizar las células. El potasio presente se detectó mediante un electrómetro específico para este catión.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

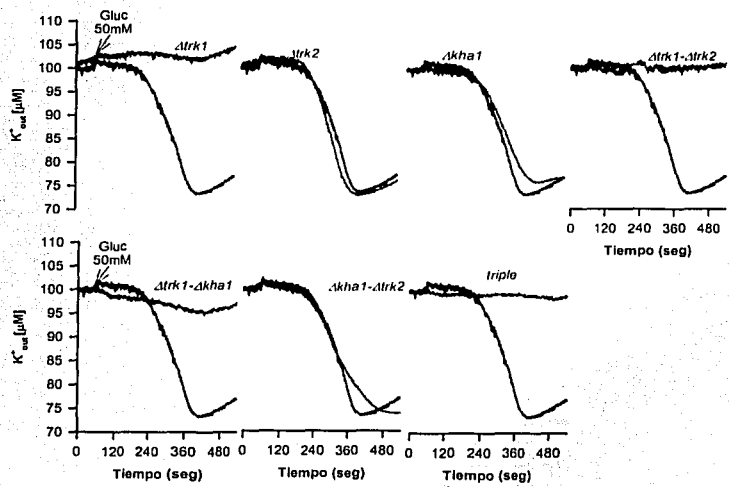


Figura 9. Transporte de potasio de las cepas Fy833 y las mutantes a pH 8.0. Las células se crecieron en medio YPD 18 hr y se ayunaron 15 hr. Después de colocar el medio de cada experimento (bicina-TEA 2 mM, pH 8.0; más 100μM de KCl), para un volumen final de 10 ml, se inició el trazo y se agregaron 125 mg de células. Posteriormente se agregó 50 mM de glucosa con la finalidad de energizar las células. El potasio presente se detectó mediante un electrómetro específico para este catión.

El bombeo de protones.

En los resultados de las figuras 10 a 12 se muestran los registros de pH extracelular, seguidos con un electrodo de combinación para pH. Los trazos se iniciaron con el registro del pH de la solución (línea base); en el medio a pH 6.0 (Fig. 10), al momento de la adición de las células de la cepa silvestre (Fig. 10 a) se observó una alcalinización del medio, seguida de una pequeña recuperación y una estabilización del trazo. Posteriormente, al agregar glucosa al medio (después de 2 a 3 min) se observó una acidificación (trazo hacia

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

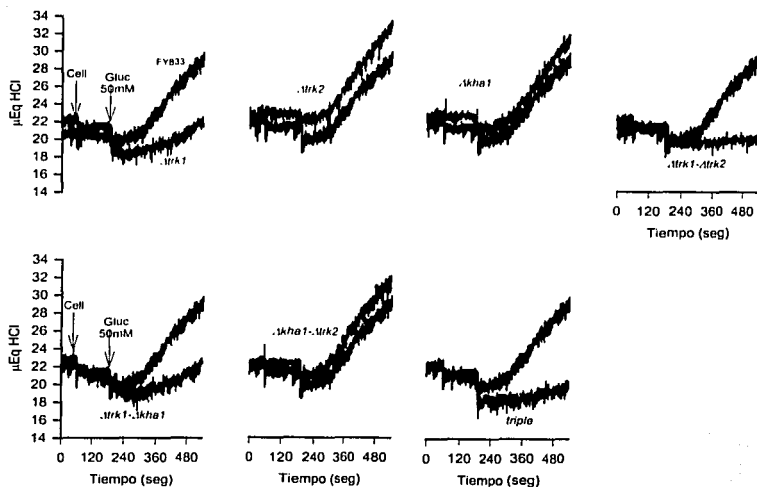


Figura 10. Bombeo de protones al medio por las cepas Fy833 y las mutantes obtenidas, a pH 6.0. Las células se crecieron en medio YPD 18 hr y se ayunaron 15 hr. Después de colocar el medio de cada experimento (MES-TEA 2 mM, pH 6.0) en la cámara, para un volumen final de 10 ml, se inició el trazo de lectura y se agregaron 125 mg de células. Posteriormente se agregó 50 mM de glucosa, para energizar las células. Los protones presentes en la cámara se detectaron mediante un electrodo de pH.

arriba) que continuó por lo menos 5 minutos más. Este trazo se utilizó para comparar con todas las cepas mutantes (Figuras 10 a, 11 a y 12a). Como se esperaba, y dado que la H^+ -ATPasa debe vencer la resistencia de la concentración de los protones externos, (Peña *et al.*, 1972), el bombeo aumenta a medida que aumenta el pH. No obstante, en las tres condiciones, (pH 4.0, 6.0 y 8.0), se observó un patrón semejante, que consiste en lo siguiente:

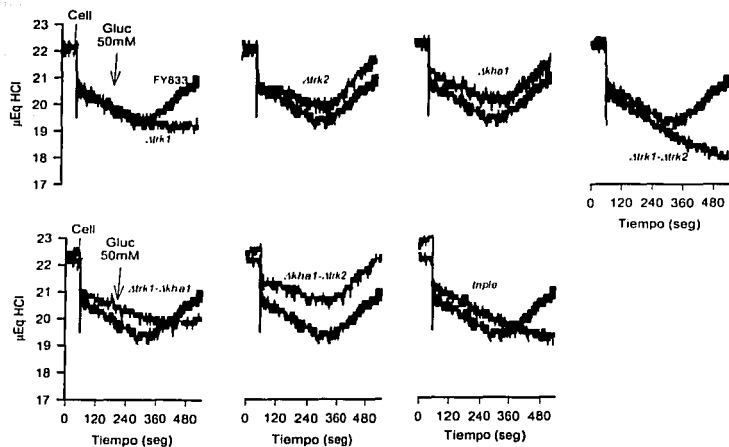


Figura 11. Protones bombeados al medio, por las cepas Fy833 y las distintas mutantes a pH de 4.0. Las células se crecieron en medio YPD 18 hr y se ayunaron 15 hr. Después de colocar el medio de cada experimento (ácido tartárico-TEA 2 mM, pH 6.0) en la cámara, para un volumen final de 10 ml, se inició el trazo de lectura y se agregaron 125 mg de células. Posteriormente se agregó 50 mM de glucosa, para energizar las células. El registro de los protones se registró mediante un electrodo de pH.

- El bombeo que normalmente se observó con la cepa silvestre disminuyó sustancialmente en la cepa *Δtrk1*, aunque no totalmente.
- Aunque en el estudio del transporte del K^+ , en especial a pH 6.0, el transporte desaparece al eliminar *Trk1p*, no sucede así con el bombeo de protones, pues aún en ausencia de este transportador, hay un bombeo lento de protones al agregar glucosa.
- Si bien la eliminación de *Trk2p* en la cepa silvestre no modificó el bombeo, al tener la doble mutante de *Trk1p* y *Trk2p* sí se observa un efecto aditivo en este

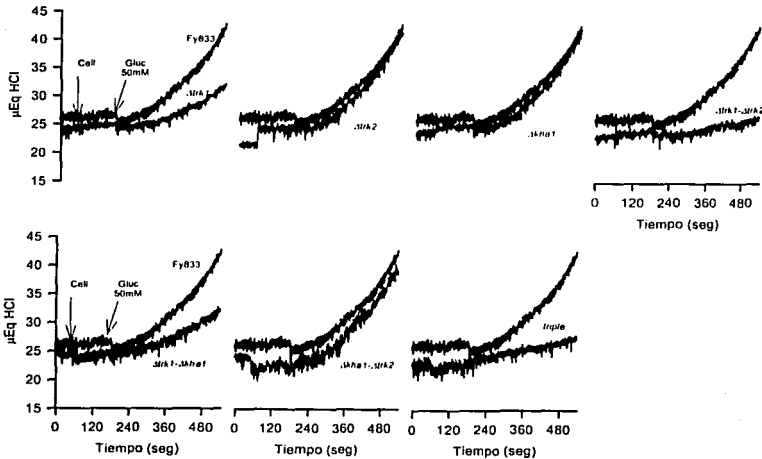


Figura 12. Bombeo de protones al medio por las cepas Fy833 y las mutantes, a pH 8.0. Las células se crecieron en medio YPD 18 hr y se ayunaron 15 hr. Después de colocar el medio de cada experimento (bicina-TEA 2 mM, pH 8.0) en la cámara, para un volumen final de 10 ml, se inició el registro y se agregaron 125 mg de células. Posteriormente se agregó 50 mM de glucosa, con la finalidad de energizar las células. El registro de protones se siguió mediante un electrodo de pH.

parámetro, de modo que en las mutantes carentes de Trk1p y Trk2p se abatió por completo la acidificación del medio, a excepción, de lo observado a pH 8.0, en donde todavía se observó una acidificación remanente, aún en la mutante triple (Fig. 12g). Inclusive, a pH de 4.0, la eliminación de Trk1p ocasionó, luego de la adición de la glucosa, un valor constante del pH del medio, mientras que en las mutantes en las que

se eliminaron ambos, Trk1p y Trk2p, se observó una alcalinización lenta pero constante.

- La ausencia de Kha1p no produjo ningún cambio en el comportamiento, ni al eliminarlo solo, ni en combinación con los otros transportadores.

Dado el inevitable ruido que se obtiene siguiendo los cambios del medio con el electrodo de pH, y para observar la estimulación del bombeo de H^+ después de agregar concentraciones mayores de K^+ a las células mutantes, se decidió seguir los cambios utilizando el púrpura de bromocresol como indicador de pH externo. En una celda se colocaron las células en un amortiguador MES-TEA pH 6.0, 2 mM, más el indicador de pH; los cambios de la absorbencia se siguieron de 494-587 nm, en un espectrofotómetro de doble longitud de onda.

El inicio del trazo de la cepa silvestre se realizó sin la adición de la glucosa, para generar una línea base. Al agregar la glucosa se observó, con un cierto retraso, una acidificación del medio pequeña y rápida, tal vez efecto de la dilución, y después el trazo regresó de nuevo a la línea base. Aproximadamente dos minutos después de la adición de la glucosa, se estimuló el bombeo de H^+ , que decayó ligeramente con el tiempo. Diez minutos después de iniciado el trazo, se agregó KCl, que causó una ligera disminución del pH extracelular, aparentemente por algún efecto de asociación del KCl con el colorante. Partiendo de este nuevo valor inicial, el bombeo de H^+ volvió a estimularse, y la curva de acidificación, rápida en un principio, fue decayendo en el tiempo. Este trazo se empleó como control para poder comparar con las otras cepas mutantes (Figura 13a). Los cambios más relevantes son los siguientes:

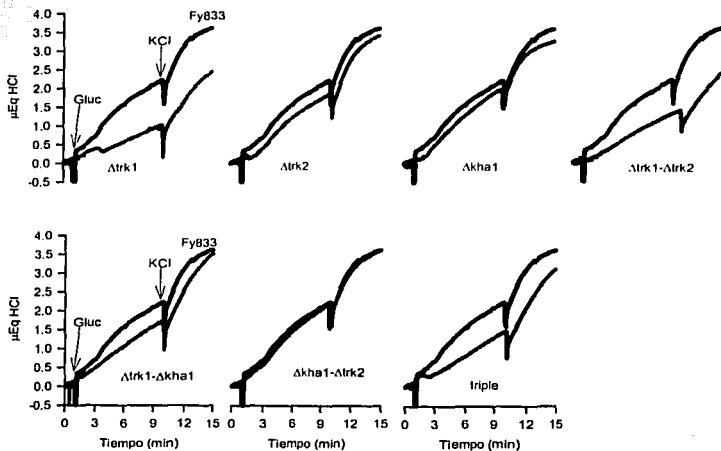


Figura 13. Bombeo de protones al medio por las cepas Fy833 y las mutantes, a pH 6.0, seguido por los cambios del púrpura de bromocresol. Las células se crecieron en YPD 18 hr y se ayunaron 15 hr. Se agregaron 25 mg de levaduras a una celda con MES-TEA pH 6.0, 2 mM, más púrpura de bromocresol (4 µg/ml de concentración final) para un volumen final de 2 ml. Al avanzar el trazo, se agregó 50 mM de glucosa para energizar las levaduras. Posteriormente se agregó 50 mM de KCl para observar los cambios del bombeo de H⁺. Las lecturas se realizaron de 494-587nm en un espectrofotómetro de doble longitud de onda dual (DW2, conversión Olis).

- Como se esperaba, el cambio del pH al agregar la glucosa es más lento en la mutante sin Trk1p, tanto sola como en distintas combinaciones. Sin embargo, con estas concentraciones de K⁺ (50 mM), la adición del catión produjo un aumento importante en el bombeo de protones.
- Llama la atención también que en las mutantes en que no están presentes ni Trk1p ni Trk2p, al agregar 50 mM de KCl de todas formas se observó un aumento importante de la acidificación.

Determinación del pH intracelular.

La estimación del pH intracelular se realizó empleando piranina introducida a las células por medio de electroporación. La electroporación se realizó según se describe en material y métodos. Las células cargadas con piranina se colocaron en un amortiguador MES-TEA 2mM, pH 6.0; y con el empleo de un fluorómetro, se midió la fluorescencia de 460-520nm. De ésta se calcularon los valores del pH mediante la ecuación de Henderson-Hasselbalch. Se obtuvieron los trazos antes de agregar glucosa, del efecto de este sustrato y luego de la adición de KCl.

Los trazos de la Figura 14, muestran en su valor inicial una línea base de pH interno característico para cada cepa, que mostró un aumento ligero luego de la adición de la glucosa, y un aumento mucho más rápido al agregar el K^+ . En el trazo de la cepa silvestre, inmediatamente después de ser agregado el monosacárido, se observó, como en otras cepas (Peña y cols., 1998), una acidificación pequeña y pasajera del interior celular, seguida de un aumento ligero del pH. Al agregar el K^+ se observó un aumento rápido del pH, que llegó a un valor estable alrededor de 6.2. Este trazo se compara como control experimental, con los de las mutantes construidas. Los datos más relevantes de estos experimentos son los siguientes:

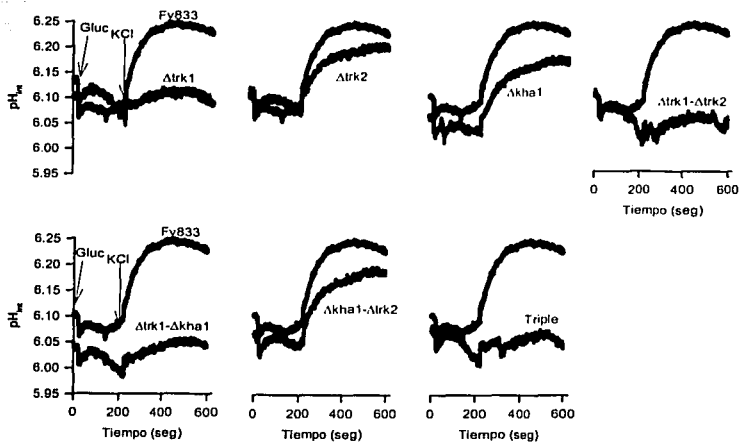


Figura 14. Cambios del pH intracelular, de las cepas Fy833 y las diferentes mutantes a pH 6.0. Efecto del K^+ . Las células se crecieron en YPD 18 hr y se ayunaron 15 hr. De las células electroporadas con piranina (a un pulso de 2KV, 25 μ F y 200 Ω) y resuspendidas al 50% en H₂O dd, se toman 25 mg de levaduras y se introducen en una celda que contiene MES-TEA pH 6.0, 2 mM, para un volumen final de 2 ml. El trazo se inició agregando las células ante agitación constante. Pasados 60 seg se agregó glucosa 50 mM. Posteriormente se agregó KCl 50 mM.

- El aumento producido por la adición del KCl fue menor en todas las cepas carentes del transportador Trk1p, independientemente de si está o no presente Trk2p (Fig. 14: a, d, e y g).
- Aunque en la Figura 14 (b, c y f) las mutantes carentes de Kha1p y Trk2p mostraron un menor aumento del pH interno (en relación a la silvestre) al agregar el KCl, esto no se repitió en otros experimentos.

- Las diferencias del pH inicial que se observan tampoco son reproducibles de un experimento a otro.

En relación con estos experimentos, es necesario señalar también que a diferencia de la cepa empleada por Calahorra y cols. (1998), en esta cepa de levadura, después de la electroporación, la piranina no se acumula en la vacuola, no obstante que se le incuba en presencia de glucosa o de glucosa más K^+ . Esto se verificó observando las células al microscopio, de modo que se tiene la seguridad de que el pH que se mide corresponde al citoplasma.

Estimación del potencial de membrana.

En la Figura 18, se estimó el potencial de membrana, empleando a la 3,3'-dipropiltiacarbocianina, o DiSC₃(3), colorante que se distribuye siguiendo la formación del potencial de membrana y en las condiciones que se utilizó aumenta su fluorescencia a medida que aumenta el $\Delta\Psi$ a ambos lados de la membrana plasmática (Peña y cols., 1984). Los cambios en la fluorescencia de este compuesto se siguieron a 540 nm de excitación y 590 nm de emisión en un espectrofluorómetro.

En la celda que contenía la mezcla de incubación, se agregaron las células de la cepa silvestre, dejándolas incubar por dos minutos antes de llevarlas al fluorómetro. Luego, al cabo de 200 segundos, se inició el trazo basal, agregando luego la cianina, que produce un aumento de la fluorescencia, que se estabiliza unos minutos después de agregado el colorante. El potencial de membrana generado por la actividad de la H^+ -ATPasa, se abate

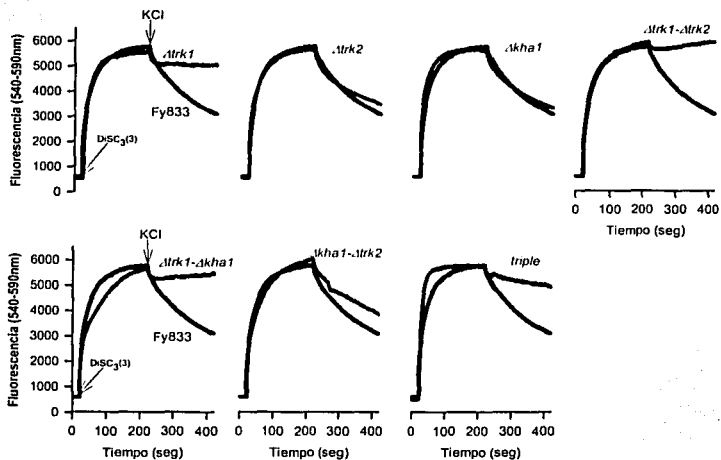


Figura 15. Estimación del potencial de membrana de la cepa Fy833 y las mutantes; efectos del K^+ , a pH 6.0. Las células se crecieron en YPD 18 hr y se ayunaron 15 hrs. En la celda del fluorómetro se agregó: CCCP 10 μ M, $CaCl_2$ 100 μ M, glucosa 50 mM y MES-TEA pH 6.0, 2 mM, para un volumen final de 2ml. Se colocó la celda en el fluorómetro, con agitación constante, agregando 25 mg de levaduras e incubándolas durante dos minutos. El potencial de membrana se estimó agregando cianina 0.25 μ M. Posteriormente se agregó KCl (50mM) para observar el abatimiento del potencial de membrana formado inicialmente. La fluorescencia se siguió en el tiempo a 540 \rightarrow 590 nm de excitación y emisión, respectivamente.

en buena parte por la adición de K^+ al medio, y el trazo muestra una disminución de los niveles de fluorescencia. El abatimiento del potencial de membrana de las células de la cepa silvestre, lleva los niveles de fluorescencia a cerca de la mitad del valor máximo inicial (Fig. 15 a). Los resultados de las cepas mutantes se muestran en las Figs. 15 a 17,

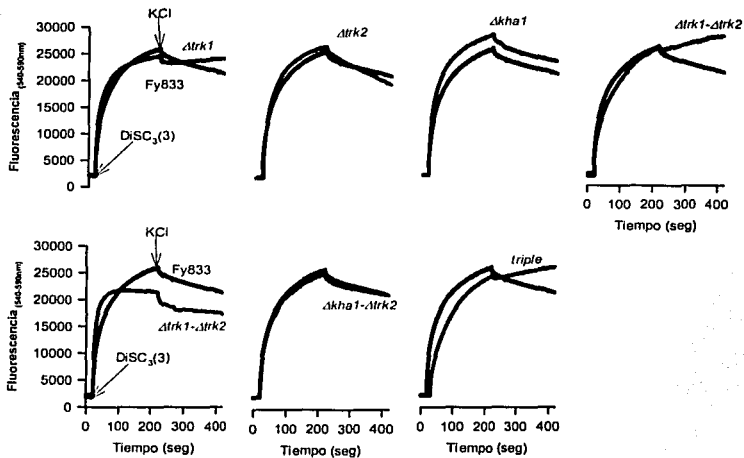


Figura 16. Estimación del potencial de membrana de la cepa Fy833 y las mutantes; pH 4.0. Efecto de la adición de K^+ . Las células se crecieron en YPD 18 hr y se ayunaron 15 hrs. En la celda del fluorómetro se agregó: CCCP 10 μ M, $CaCl_2$ 100 μ M, glucosa 50 mM y ácido tartárico-TEA pH 4.0, 2 mM, para un volumen final de 2ml. Se colocó la celda en el fluorómetro, con agitación constante, agregando 25 mg de levaduras e incubándolas durante dos minutos. El potencial de membrana se estimó agregando cianina 0.25 μ M. Posteriormente se agregó KCl (50mM) para observar el abatimiento del potencial de membrana formado inicialmente. La fluorescencia se siguió en el tiempo a 540 \rightarrow 590 nm de excitación y emisión, respectivamente.

que corresponden a experimentos realizados a pH 6.0, 4.0 y 8.0, respectivamente, y pueden resumirse como sigue (Figs. 15 a 17):

- Las mutantes en que se eliminó el transportador Trk1p no mostraron la disminución del potencial que se observa en la cepa silvestre al agregar K^+ . En particular a pH 8.0 (Fig. 17, a), la sola ausencia de Trk1p parece dejar todavía lugar a una disminución del

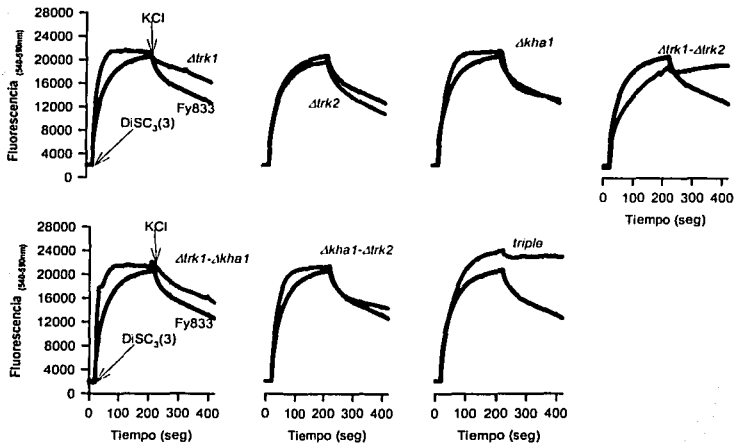


Figura 17. Estimación del potencial de membrana de la cepa Fy833 y las mutantes; pH 8.0. Efecto de la adición de K^+ . Las células se crecieron en YPD 18 hr y se ayunaron 15 hrs. En la celda del fluorómetro se agregó: CCCP 10 μ M, $CaCl_2$ 100 μ M, glucosa 50 mM y bicina-TEA pH 8.0, 2 mM, para un volumen final de 2ml. Se colocó la celda en el fluorómetro, con agitación constante, agregando 25 mg de levaduras e incubándolas durante dos minutos. El potencial de membrana se estimó agregando cianina 0.25 μ M. Posteriormente se agregó KCl (50mM) para observar el abatimiento del potencial de membrana formado inicialmente. La fluorescencia se siguió en el tiempo a 540 \rightarrow 590 nm de excitación y emisión, respectivamente.

potencial al agregar K^+ , probablemente por la vía de Trk2p.

- Hay sin embargo una pequeña disminución del potencial al agregar el K^+ , que desaparece en la mutante en la que se eliminó Trk1p y Trk2p, incluyendo, desde luego a la mutante triple (Figs. 15 a 17, d y g).

- La ausencia de *Kha1p* no cambia de manera importante el fenotipo respecto a este parámetro a ninguno de los valores del pH estudiados.
- Aunque no de forma constante, las cepas en las que se eliminó *Trk1p* mostraron la instalación del potencial de manera más rápida, lo cual se esperaba por la ausencia de una vía de entrada del K^+ .

Parámetros cinéticos del transporte de $^{86}Rb^+$.

Los experimentos de transporte de K^+ realizados mediante el uso del electrodo específico, dado que miden la concentración del K^+ extracelular, dan información sobre el balance entre la entrada y la salida del catión, de manera que se requiere como dato adicional conocer el valor de la entrada neta del catión a diferentes valores de pH. Esto se logra en experimentos a tiempos cortos, midiendo la entrada del $^{86}Rb^+$, análogo del K^+ , que el transportador reconoce con una afinidad semejante para ambos cationes. Al hacer los experimentos con concentraciones variables del catión, es además posible obtener información sobre la afinidad y velocidad máxima del o los transportadores. Los resultados son los siguientes (Tabla 6):

- Para la cepa silvestre se obtuvo un aumento de la V_{max} y una disminución de la K_m , de manera semejante a lo reportado por Armstrong y Rothstein (1974).
- Para las mutantes en que se eliminó *Trk1p*, en términos generales disminuyó la V_{max} y aumentó el valor de la K_m , aunque los valores cuantitativos deben tomarse con reservas, debido a que siendo muy bajos los valores del transporte, la dispersión de los datos es muy grande, como puede apreciarse de los valores de R^2 .

- Las cepas carentes de Trk2p no mostraron diferencias importantes respecto a la cepa silvestre, ni aquellas en que el transportador se eliminó simultáneamente con Trk1p.
 - Tal vez el dato más importante es que la eliminación de Kha1p produjo un aumento de la velocidad máxima, ya sea en la mutante simple o en la mutante $\Delta Kha1-\Delta Trk2p$.
- Como ya se señaló, los otros datos deben tomarse con reserva por la dispersión de los datos.

pH 4.0

	FY833	$\Delta trk1$	$\Delta trk2$	$\Delta kha1$	$\Delta trk1-\Delta trk2$	$\Delta trk1-\Delta kha1$	$\Delta kha1-\Delta trk2$	Triple
V_{max}	0.157	0.127	0.161	0.148	0.119	0.107	0.233	0.148
K_m	0.829	5.070	1.191	0.883	2.631	2.724	1.114	5.307
R^2	0.948	0.943	0.994	0.916	0.857	0.968	0.971	0.924

pH 6.0

	FY833	$\Delta trk1$	$\Delta trk2$	$\Delta kha1$	$\Delta trk1-\Delta trk2$	$\Delta trk1-\Delta kha1$	$\Delta kha1-\Delta trk2$	Triple
V_{max}	0.266	0.048	0.220	0.319	0.023	0.107	0.347	0.042
K_m	0.329	1.698	0.337	0.350	0.248	1.251	0.412	0.887
R^2	0.963	0.780	0.972	0.987	0.833	0.941	0.992	0.846

pH 8.0.

	FY833	$\Delta trk1$	$\Delta trk2$	$\Delta kha1$	$\Delta trk1-\Delta trk2$	$\Delta trk1-\Delta kha1$	$\Delta kha1-\Delta trk2$	Triple
V_{max}	0.212	0.177	0.226	0.234	0.184	0.211	0.252	0.093
K_m	0.135	0.642	0.120	0.250	2.201	0.546	0.294	0.880
R^2	0.868	0.976	0.715	0.841	0.856	0.968	0.958	0.691

Tabla 6. Parámetros cinéticos del transporte de $^{86}Rb^+$, caracterizado a diferentes valores de pH extracelular. V_{max} (nmol/mg/min) y K_m (mM).

DISCUSIÓN.

De los experimentos realizados, a pesar de que las distintas cepas sufrieron la ablación de uno o varios de los principales genes implicados en el transporte del potasio, el contenido del catión en las levaduras cultivadas bajo nuestras condiciones es esencialmente el mismo, independientemente de la condición en que se estudiaron; es decir, recién obtenidas del cultivo, o después de un ayuno de 15 horas.

Rodríguez-Navarro y Ramos (1984) describieron un sistema doble para el transporte del K^+ en *S. cerevisiae*, uno de baja, y otro de alta afinidad. Gaber, *et al.* 1988, a partir de los datos de Rodríguez-Navarro, clonó el gene TRK1 y lo eliminó de una cepa, describiéndolo como el responsable de la alta afinidad del transporte. La mutante $\Delta trk1::Kan^r$ construida en este trabajo, mostró las características fenotípicas ya demostradas por estos autores. Sin embargo, los datos aquí presentados muestran diferencias menores a las reportadas por estos autores en cuanto a los valores de la K_m . Ellos reportaron valores de la K_m para el transportador de alta afinidad de 24 μM , y de 40 mM para el de baja afinidad, mientras que nosotros encontramos valores que fueron notablemente mayores, que además coinciden con los obtenidos en la cepa carente del transportador Trk2p, que son del mismo orden (Tabla 6). Quizá las discrepancias se deban a las diferentes cepas y a las condiciones del cultivo, ya que ellos utilizaron medios sintéticos en los que controlaron la concentración del potasio, mientras que nosotros utilizamos el medio YPD, que contiene aproximadamente 15 mM de potasio.

La función y consecuencias de la presencia de Trk1p:

Encontramos también que la simple ablación del gene *TRK1*, es causante del principal fenotipo observado, tanto en la mutación aislada, como en sus distintas combinaciones. El comportamiento de las cepas obtenidas puede resumirse como sigue:

- Se observó en todos los casos la disminución drástica de la velocidad del transporte, tanto medida con el electrodo de K^+ , como con $^{86}Rb^+$.
- Las células carentes de este gene no mostraron la respuesta habitual a los cambios del pH extracelular al agregar K^+ . Si acaso en los experimentos en que este parámetro se midió con el púrpura de bromocresol; se observó una respuesta, que debe ser estudiada con más detalle.
- Las cepas con el genotipo $\Delta trk1$ no responden con el incremento que el K^+ produce en el pH interno de las células de la cepa silvestre, como ocurre en otras levaduras (Peña *et al.*, 1998).
- El genotipo $\Delta trk1$ tampoco muestra la disminución del $\Delta\Psi$ que se observa en la cepa silvestre.

Todos estos datos concuerdan con la idea de Trk1p como el principal transportador del K^+ en la levadura, que es impulsado por la diferencia del potencial eléctrico generado por la H^+ -ATPasa de la membrana plasmática; encargándose de la mayor parte de la entrada del catión, como se muestra en las figs. 4 a 6. Al entrar este ion, se produce el abatimiento del potencial de la membrana, como se mostró en las figs. 15 a 17; dando lugar a la estimulación de la H^+ -ATPasa (Seto Young y Perlin, 1991), que aumenta así el bombeo de los protones, acelerando la acidificación del medio (Figs. 10 a 13) y aumentando también el pH del interior celular (Fig. 14). Obviamente que estos efectos desaparecen en ausencia del

gene y de su producto polipeptídico respectivo, como se observa en las figuras señaladas para las cepas en las que se eliminó este gene. Es interesante señalar que hasta la fecha no existían estudios completos de todos estos parámetros en las cepas en que se produjo la ablación del gene, sino simplemente la medida del transporte del K^+ .

El papel de Trk2p:

En términos generales, y de acuerdo con nuestros experimentos, Trk2p no es un transportador esencial; al menos en nuestras condiciones no tuvo ningún papel relevante, ni ante su ablación aislada en la cepa silvestre, ni en combinación con los otros transportadores, pues su ausencia no produjo mayores efectos en ninguno de los parámetros estudiados: transporte de K^+ , bombeo de protones al exterior, cambios del pH interno de las células, cambios de la diferencia de potencial de la membrana plasmática, ni en las constantes cinéticas del transporte del $^{86}Rb^+$.

El papel de Kha1p:

Los resultados de la eliminación del gene KHA1 en el fondo genético de FY833, son diferentes a los ya descritos por Ramírez, *et al.* 1998. Nuestros resultados muestran que la eliminación de este antiportador no afectó la regulación de la salida del K^+ de la célula, esto se muestra en las mediciones de K^+ intracelular y del registro con electrodo de K^+ . Tampoco la ausencia de este gene afectó la propia regulación interna del pH intracelular. Es decir, que su simple eliminación no afecta drásticamente el fenotipo fisiológico ya observado en la cepa silvestre a pH 6.0. Esto mismo pasa con la mutante que tiene eliminado el gene de *TRK2*. Ambos resultados se comprueban con la mutante doble $\Delta kha1-\Delta trk2$, que presenta una respuesta fisiológica similar a la silvestre. Los efectos

observados antes, se deben al fondo genético de la levadura utilizada (R757 α), incapaz de sintetizar suficiente uracilo, que no parece estar en cantidad suficiente en el medio YPD. Aún si se le agrega al medio, las células de la cepa silvestre muestran una capacidad insuficiente para bombear protones y transportar el K⁺, que obviamente se recuperó al hacer la interrupción del gene *KHA1* con el gene de *URA3*.

En este trabajo, se encontró que la presencia del gene *KHA1* no es esencial, y su ablación no produjo cambios importantes en el funcionamiento de las células. Ninguno de los parámetros estudiados mostró cambios significativos, ni en la cepa en que se eliminó solo, ni en combinación con los otros dos. O bien se trata de un gene que puede ser sustituido por otro, o su papel es secundario en la fisiología de la levadura. En algunos experimentos preliminares realizados por J. Ramírez en nuestro laboratorio, marcando el transportador con la proteína verde fluorescente, parece no localizarse en la membrana plasmática de las células.

CONCLUSIONES

- Trk1p es el principal sistema de transporte para el K^+ en la levadura, y su presencia es la principal responsable de los efectos esperados de su actividad, respecto al mismo transporte del ion potasio, los cambios del pH del medio y del interior de la célula, así como de la diferencia del potencial eléctrico de la membrana.
- Trk2p, bajo estas condiciones de estudio, parece jugar un papel secundario en el transporte del K^+ ; aunque debe tomarse en cuenta el trabajo de Ramos y cols. (1994), que señalan que este transportador puede presentar una moderada afinidad por el K^+ .
- Kha1p parece no tener una función esencial en la levadura, ni en el transporte del K^+ ni en la regulación del pH.

PERSPECTIVAS.

- Dado que se ha descrito también el gene *NHA1* como un intercambiador catión/ H^+ , es necesario estudiar sus mutantes, tanto eliminándolo por separado, como simultáneamente con *KHA1*. Es necesario investigar si ambos genes se complementan, o tienen funciones vicariantes; es decir, si la ausencia de uno es compensada por el otro o no.
- Existe también el gene *NXP1*, que aunque se describió localizado en el interior de la célula y no en la membrana plasmática, podría tener algún papel en la regulación del pH interno de la levadura.
- Es necesario completar los estudios del gene marcado con la proteína verde fluorescente para definir su localización.
- Pudiera ser necesario obtener mutantes en las cuales se eliminen los tres genes planteados como presuntos implicados en la regulación del pH interno de la levadura, sin que a la fecha se defina cuál o cuáles son los importantes.
- Luego de los estudios de Ramos y cols (1994), no se ha estudiado la posible dualidad de Trk2p, que según ellos puede adoptar el papel de transportador de alta afinidad cuando las células carentes de Trk1p se crecen en concentraciones bajas de potasio. Este mismo grupo ha planteado la posibilidad de que Trk1p y Trk2p formen heterodímeros o sistemas de más subunidades, que tendrían una función semejante, pero no igual a la de Trk1p.
- Sería interesante medir tanto el RNAm, así como los niveles de proteína de Trk2p en las diferentes mutantes (construidas en el trabajo anterior), así como en la cepa

silvestre, para observar si la proteína en realidad se expresa o regula de acuerdo con las nuevas condiciones de ausencia y presencia de genes como TRK1, KHA1 y NHA1.

- Queda finalmente por estudiar la regulación de los genes del transporte, que comparten la propiedad de contar con un extremo carboxilo intracelular muy largo, aunque algunos experimentos preliminares realizados por Sychrová (no publicados) indican poca influencia de este fragmento en mutantes en las que se expresó Nha1p sin esta región de la proteína.
- Hay propuestas de que la vacuola desempeña un papel importante durante la homeostasis del K^+ y del pH intracelular. Sería necesario desarrollar nuevos métodos para destacar la importancia de este organelo durante la homeostasis de ambos iones.

BIBLIOGRAFÍA.

1. Armstrong, W. McD., Rothstein, A. 1964. Discrimination between alkali metal cations by yeast. *J. Gen. Physiol.* 48:61-71.
2. Arnold, I., Pfeiffer, K., Neupert, W., Stuart R. A., Schagger H. 1998. Yeast mitochondrial F_1F_0 -ATP synthase exists as a dimmer: identification of three dimmer-specific subunits. *EMBO J.* 17 (24):7170-7178.
3. Bañuelos, M. A., Ruiz, M. C., Jimenez, A., Souciet, J-L., Potier, S., Ramos, J. 2002. Role of the Nha1 antiporter in regulating K^+ influx in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast.* 19:9-15.
4. Bertl, A., Bihler, H., Reid, J. D., Kettner, C., Slayman, C. L. 1998. Physiological characterization of yeast plasma membrane outward rectifying K^+ channel, DUK1 (TOK1), in situ. *J. Membr. Biol.* 162:67-80.
5. Broach, J. R., Pringle J. R., Jones E. W. 1991. The molecular and cellular biology of the yeast *Saccharomyces*. Genome dynamics, protein synthesis and energetic. Vol 1. Cold Spring Harbor laboratory. New York, USA.
6. Brown, T. A. 1999. *Genomes*. Wiley-Liss, New York, USA.
7. Calahorra, M., Martínez, G., Hernández-Cruz, A., Peña, A. 1998. Influence of monovalent cations on yeast cytoplasmic and vacuolar pH. *Yeast* 14:501-515.
8. Calero, F., Gómez, N., Ariño, J., Ramos, J. 2000. Trk1 and Trk2 define the major K^+ transport system in fission yeast. *J. Bacteriol.* 182,2:394-399.
9. Conway, E. J., 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.
10. Conway, E. J., Brady, T. G., 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.
11. Conway, E. J., Downey, M. 1950. pH values of the yeast cell. *Biochem. J.* 47:355-360.
12. Conway, E. J., Duggan, F. 1958. A cation carrier in the yeast cell wall. *Biochem. J.* 69:265-274.
13. Conway, E. J., Kernan R. P. 1955. The effect of redox dyes on the active transport of hydrogen, potassium and sodium ions across the yeast cell membrane. *Biochem. J.* 61:32-36.
14. Conway, E. J., 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.
15. Conway, E. J., Ryan, H., Carton, E. 1954. Active transport of sodium ions from the yeast cell. *Biochem. J.* 58:158-167.
16. Damaskin, B. B., Petri, O. A. 1981. Fundamentos de la electroquímica teórica. MIR, Moscú. P 331.

17. Entian, K. D., Schuster, T., Hegemann, J. H., Becher, D., Feldmann, H., Güldener, U., Götz, R., Hansen, M., Hollenberg, C. P., Jansen, G., Kramer, W., Klein, S., Kötter, P., Kricke, J., Launhardt H., Mannhaupt, G., Maiert, A., Meyer, P., Mewes, W., Munder, T., Niedenthal, R. K., Ramazani Rad, M., Röhmer, A., Römer A., Rose, M., Schäfer, B., Siegler, M. L., Vetter, J., Wilhelm, N., Wolf K., Zimmermann, F. K., Zollner, A., Hinnen, A. 1999. Functional analysis of 150 deletion mutants in *Saccharomyces cerevisiae* by a systematic approach. *Mol. Gen. Genet.* 262:683-702.
18. Fairman C., Zhou, X. L., Kung C. 1999. Potassium uptake through the TOK1 K⁺ channel in budding yeast. *J. Membr. Biol.* 168:149-157.
19. Gaber, R. F., Ayles, C. A., Fink, G. R. 1988. TRK1 encodes a plasma membrane protein required for high-affinity potassium transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 8:2848-2858.
20. Garland, P. 1992. Obituary: Peter Mitchell (1920-1992). *Nature.* 35:747.
21. Goffeau, A., Barrell, B. G., Bussey, H., Davis, R. W., Dujon, B., Feldmann, H., Galibert, F., Hoheisel, J. D., Jacq, C., Jonston, M., Louis, E. J., Mewes, H. W., Murakami, Y., Philippsen, P., Tettelin, H., Oliver, S. G. 1996. Life with 6000 genes. *Science* 274:546, 563-567.
22. Gustafsson, L., Norkrans, B. 1976. On the mechanism of salt tolerance; production of glycerol and heat during growth of *Debaryomyces hansenii*. *Arch. Microbiol.* 110:177-183.
23. Haro, R. Rodríguez-Navarro, A. 2002. Molecular analysis of the mechanism of potassium uptake through the TRK1 transporter of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim. Biophys. Acta* 1564:114-122.
24. Hauer, M., Narita, V., Donhardt, A. M., Naider, F., Becker, J. M. 2001. Multiplicity and regulation of genes encoding peptide transporters in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Mem. Biol.* 18:105-112.
25. Hervesy, G., Nielsen, N. 1941. Potassium interchange in yeast cells. *Acta. Physiol. Scand.* 2:347.
26. Hirokawa, G., Kiel, M., Muto, A., Kawai, G., Igarashi, K., Kaji, H., Kaji, A. 2002. Binding of ribosome recycling factor to ribosomes, comparison with tRNA. *J. Biol. Chem.* 277,39:35847-35852.
27. Ketchum, K., Joiner, W., Seller, A., Kaczmarek, L., Goldstein, S. 1995. A new family of outwardly rectifying potassium channel protein with two pore domains in tandem. *Nature.* 374:690-695.
28. Ko, H. C., Buckley A. M., Gaber, R. 1990. TRK2 is required for low affinity K⁺ transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics.* 125:305-312.
29. Laidler, K. J., Meiser, J. H. 1998. *Fisicoquímica.* 2^{da} Ed. Continental, México.
30. Lasnitzki, A., Szörényi E. 1934. The influence of alkali cations on the fermentation capacity of yeast. *Biochem. J.* 31:580-587.
31. Latorre, R., López-Barneo, J., Bezanilla, F., Llinás, R. (Edits). 1996. *Biofísica y fisiología celular.* Universidad de Sevilla, España.

32. Lewin, B. 2000. Genes VII, Oxford university press. New York, USA.
33. Lodish, H., Berk, A., Zipursky, L., Matsudaira, P., Baltimore, D., Darnell, J. 2000. Molecular cell biology. 4th Edt, Freeman and company. USA.
34. Longtine, M. S., McKenzie, A., Demarini, D. J., Shah, N. G., Wach, A., Bracht, A., Philippsen, P., Pringle, J. 1998. Additional modules for versatile and economical PCR-based gene deletion and modification in *Saccharomyces cerevisiae*. Yeast. 14:953-961.
35. López, R., Enriquez, E., Peña, A. 1999. Effects of weak acids on cation accumulation, ΔpH and $\Delta \Psi$ in yeast. Yeast. 15:553-562.
36. López, R., Peña, A. 1999. Potassium transport in yeast. Rev. Latinoam. Microbiol. 41:91-103.
37. Madigan, M. T., Martinko, J. M., Parker, J. 1997. Brock. Biología de los microorganismos. 8^{va} Ed. Prentice Hall, Madrid, España.
38. Mathews, C. K., Van Holde K. E. 1998. Bioquímica. McGraw-Hill/Interamericana. Madrid, España.
39. Miosga, T., Witzel, A., Zimmermann, F. K., 1994. Sequence and function analysis of a 9.46Kb fragment of *S. cerevisiae* chromosome X. Yeast. 10:965-973.
40. Miranda, M., Ramírez, J., Peña, A., Coria, R. 1995. Molecular cloning of the plasma membrane H^+ -ATPase from *Kluyveromyces lactis*: a single nucleotide substitution in the gene confers ethidium bromide resistance and deficiency in K^+ uptake. J. Bacteriol. 177:2360-2367.
41. Miranda, M., Pardo, J. P., Allen, K. E., Slayman, C.W. 2002. Stalk segment 5 of the yeast plasma membrane H^+ -ATPase. Labeling with a fluorescent maleimide reveals a conformational change during glucose activation. J. Biol. Chem. 277:40981-40988
42. Mitchell, P. 1961. Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism. Nature. Jul. 8; 191:144-148.
43. Mitchell, P. 1978. Protonmotive chemiosmotic mechanisms in oxidative and photosynthetic phosphorylation. TIBS. March, 59-61.
44. Mulet, J. M., Leube, M. P., Kron, S. J., Ríos, G., Fink, G. R., and Serrano, R. 1999. A novel mechanism of ion homeostasis and salt tolerance in yeast: the Hal4 and Hal5 protein kinases modulate the Trk1-Trk2 potassium transporter. Mol. and Cell. Biol. 19,5. P 3328-3337.
45. Nass, R., Rao, R. 1998. Novel localization of a Na^+/H^+ exchanger in a late endosomal compartment of yeast. J. Biol. Chem. 273; 33:21054-21060.
46. Nelson, D. L., Cox, M. M. 2000. Lehninger: Principles of biochemistry. 3th Edt, Worth publishers. New York, USA.
47. Nicholls, D. G. 1987. Bioenergética. Introducción a la Teoría Químiosmótica. Reverté. Barcelona, España.
48. Paulsen, I. T., Sliwinski, M. K., Nelissen, B., Goffeau, A., Saier Jr., M. H. 1998. Unified inventory of established and putative transporters encode within the complete genome of *Saccharomyces cerevisiae*. FEBS Lett. 430:116-125.

49. Peña, A. 1975. Studies on mechanism of K^+ transport in yeast. Arch. Biochem. Biophys. 167:397-409.
50. Peña, A., Borbolla, M., Uribe, S., Carrasco, S., Clemente, M. 1981. The effects of alkylguanidines on monovalent cation transport in yeast. Symposium Precedings Vth international of yeast. pp 485-490.
51. Peña, A., Cinco, G., Gómez-Puyou, A., Tuena, M., 1969. Studies on the mechanism of stimulation of glycolysis and respiration in *Saccharomyces cerevisiae*. Biochim. Biophys. Acta. 180:1-8.
52. Peña, A., Cinco, G., Gómez-Puyou, A., Tuena, M. 1972. Effect of the pH of the incubation medium on glycolysis and respiration in *Saccharomyces cerevisiae*. Arch. Biochem. and Biophys. 153:413-425.
53. Peña, A., Ramírez, J. 1991. An energy-dependent efflux system for potassium ions in yeast. Biochim. Biophys. Acta. 1068:237-244.
54. Peña, A., Ramírez, J., Rosas G., Calahorra, M. 1995. Proton pumping and the internal pH of yeast cells, measured with pyranine introduced by electroporation. J. Bacteriol. 177 (4):1017-1022.
55. Peña, A., Uribe, S., Pardo, J. P., Borbolla, M. 1984. The use of a cyanine dye in measuring membrane potential in yeast. Arch. Biochem. Biophys. 231:217-225.
56. Peña, A. La regulación del transporte del K^+ en la levadura. En: Los perfiles de la Bioquímica en Mexico. Estrada- O., S. y Martuscelli, J., Editores. 1975. UNAM, México, pp. 367-380.
57. Peña, A., Cinco, G. Efecto del transporte de K^+ sobre la glucólisis en *Saccharomyces cerevisiae*, consideraciones energéticas. En: Ensayos Bioquímicos. Guillermo Soberón, editor, 1969. La Prensa Médica Mexicana, México, pp. 19-28.
58. Peña, A. 1986. Las membranas de las células. Fondo de Cultura Económica. Colección La Ciencia para todos, No 18. México. P 161.
59. Peña, A., Dreyfus, G. 1990. La energía y la vida. Fondo de Cultura Económica. Colección La Ciencia para todos, No 92. México. P 98.
60. Peña, A. 1995. ¿Cómo funciona una célula? Fisiología celular. Fondo de Cultura Económica. Colección La Ciencia para todos, No 122. P 121.
61. Peña, A. 2001. Qué es el metabolismo. Fondo de Cultura Económica. Colección La Ciencia para todos. México, No 184. P 125.
62. Phaff, H. J., Miller, M. W., Mrak, E. M. 1978. The life of yeast. Harvard University Press, Cambridge. USA.
63. Prior, C., Potier, S., Souciet, J. L., Sychrova, H. 1996. Characterization of the NHA1 gene encoding a Na^+/H^+ -antiporter of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. FEBS letters. 387:89-93.
64. Pulver, R., Verzar, F. 1940. Connexion between carbohydrate and potassium metabolism in the yeast cell. Nature. 145:823-824.

65. Ramakrishnan, V. 2002. Ribosome structure and the mechanism of translation. *Cell*. 108,22:557-572.
66. Ramírez, J., Peña, A., Montero-Lomeli, M. 1996. H⁺/K⁺ exchange in reconstituted yeast plasma membrane vesicles. *Biochim. Biophys. Acta*. 1285:175-182.
67. Ramírez J., Ramírez O., Saldaña C., Coria R., Peña A. 1998. A *Saccharomyces cerevisiae* mutant lacking a K⁺/H⁺ exchanger. *J. Bacteriol.* 180,22; 5860-5865.
68. Ramos, J., Contreras, P., Haro R., Rodríguez-Navarro, A., 1985. A potassium transport mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch. Microbiol.* 143: 88-93.
69. Ramos, J., Alijo, R., Haro R., Rodríguez-Navarro, A., 1994. TRK2 is not a low-affinity potassium transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* 176:249-252.
70. Ramos, J. 1999. Contrasting salt tolerance mechanism in *Saccharomyces cerevisiae* and *Debaryomyces hansenii*. *Recent. Res. Devel. Microbiol.* 3: 377-390.
71. Rodríguez-Navarro, A., Ramos J. 1984. Dual system for potassium transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* 159, 3:940-945.
72. Rothstein, A. 1974. Relationship of cation influxes and effluxes in yeast. *J. General Physiol.* 64:608-621.
73. Rothstein, A., Bruce, M. 1958. The efflux of potassium from yeast cells into a potassium free medium. *J. Cell Comp. Physiol.* 51:439-455.
74. Rothstein, A., Bruce M. 1958. The potassium efflux and influx in yeast at different potassium concentrations. *J. Cell Comp. Physiol.* 51:145-156.
75. Rothstein, A., Demis, C. 1953. The relationship of the cell surface to metabolism. The stimulation of fermentation by extracellular potassium. *Arch. Biochem. Biophys.* 44; 18-28.
76. Rothstein, A., Enns, L.H. 1946. The relationship of potassium to carbohydrate metabolism in baker's yeast. *J. Cell Comp. Physiol.* 28:231-252.
77. Rottenberg, H., Moreno-Sánchez, R. 1993. The proton pumping activity of H⁺-ATPases: an improved fluorescence assay. *Biochim. Biophys. Acta* 1183:161-170.
78. Ryan, J. P., Ryan, H. 1972. The role of intracellular pH in the regulation of cation exchanges in yeast. *Biochem. J.* 128:139-146.
79. Saier, M. H. Jr. 1998. Molecular phylogeny as a basis for the classification of transport proteins from bacteria, archaea and eukarya. *Adv. Microb. Physiol.* 40:81-136.
80. Scheiner-Bobis, G. 2002. The sodium pump: its molecular properties and mechanics of ion transport. *Eur. J. Biochem.* 269: 2424-2433.
81. Seto-Young, D. and Perlin, D. S. 1991. Effect of membrane voltage plasma membrane H⁺-ATPase of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 266:1383-1389.
82. Stewart, R. D. y Robert Guy. 1999. Structural models of the KtrB, TrkH y Trk1,2 simporters based on the structure of the KcsAK⁺ channel. *Biophys. J.* 77:789-807.

83. Vaughan-Martini, A., Martini, A. and Cardinali, G. 1993. Electrophoretic karyotyping as a taxonomic tool in the genus *Saccharomyces*. *Antonie van Leeuwenhoek*. 63:157-163.
84. Van Belle, D., André, B. 2001. A genomic view of yeast membrane transporters. *Curr. Op. Cell Biol.* 13:389-398.
85. Walker, G. M. 1998. *Yeast physiology and biotechnology*. John Wiley and sons. Chichester, England.
86. Wang, H., Oster, G. 1998. Energy transduction in the F_1 motor of ATP synthase. *Nature*. 396 (19):279-282.
87. Yasuda, R., Noji, H., Kinosita, K., Yoshida, M., 1998. F_1 -ATPase is a highly efficient molecular motor that rotates with discrete 120° steps. *Cell*. 93:1117-1124.

Sitios en www para los distintos genes:

<http://genome-www4.stanford.edu/cgi-bin/SGD/locus.pl?locus=tok1>
<http://genome-www4.stanford.edu/cgi-bin/SGD/locus.pl?locus=kha1>
<http://genome-www4.stanford.edu/cgi-bin/SGD/locus.pl?locus=pma1>
<http://genome-www4.stanford.edu/cgi-bin/SGD/locus.pl?locus=nhx1>
<http://genome-www4.stanford.edu/cgi-bin/SGD/locus.pl?locus=trk1>
<http://genome-www4.stanford.edu/cgi-bin/SGD/locus.pl?locus=trk2>