

00551



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE MÉXICO



---

---

FACULTAD DE QUÍMICA

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO  
EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

TRANSPORTE DE POTASIO Y  
REGULACIÓN DEL pH INTRACELULAR  
DE *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE :  
**MAESTRO EN CIENCIAS (BIOQUÍMICAS)**

**P R E S E N T A :**  
**CARLOS LOZANO FLORES**

Tutor: DR. ANTONIO PEÑA DÍAZ



MÉXICO, D. F.

Noviembre 2004



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.

# TRANSPORTE DE POTASIO Y REGULACIÓN DEL pH INTRACELULAR DE *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

## RECONOCIMIENTOS

Esta tesis de maestría se realizó bajo la dirección del Dr. Antonio Peña Díaz en el Departamento de Genética Molecular del Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México.

El Comité Tutorial que asesoró el desarrollo de esta tesis estuvo formado por:

|                           |                                       |
|---------------------------|---------------------------------------|
| Dr. Antonio Peña Díaz     | Instituto de Fisiología Celular, UNAM |
| Dr. Rafael Moreno Sánchez | Instituto Nacional de Cardiología.    |
| Dr. Marina Gavilanes Ruiz | Facultad de Química, UNAM             |

Se reconoce la colaboración y asesoría del Dr. Jorge Ramírez Salcedo, de la Unidad de Microarreglos del Instituto de Fisiología Celular, UNAM.

Se reconoce la asesoría técnica de la Dra. Martha Calahorra Fuertes y la Q.F.B. Norma Sánchez Sánchez.

El proyecto fue apoyado parcialmente por CONACYT (36070-N). Durante los estudios de maestría goce de una beca otorgada por CONACYT y DGEP-UNAM para la realización de la presente tesis.

El Jurado de Examen de Maestría estuvo constituido por:

|            |                                 |                                       |
|------------|---------------------------------|---------------------------------------|
| Presidenta | Dra. Marina Gavilanes Ruiz.     | Facultad de Química, UNAM             |
| Vocal      | Dr. Edmundo Chávez Cossío       | Instituto Nacional de Cardiología.    |
| Vocal      | Dr. Roberto Coria Ortega.       | Instituto de Fisiología Celular, UNAM |
| Suplente   | Dra. Alicia González Manjarrez. | Instituto de Fisiología Celular, UNAM |
| Suplente   | Dr. Salvador Uribe Carvajal     | Instituto de Fisiología Celular, UNAM |

**A Malu.**

**A mis padres, Lourdes y Victor.**

**A mis hermanas, Liz y Lucero.**

**por compartir conmigo los triunfos y derrotas**

## **Agradecimientos.**

Con cariño y respeto a dos grandes personas: Dr. Antonio Peña y Dr. Jorge Ramírez.

A mis compañeros y amigos de laboratorio: Martha, Norma, Bertha, Marissa, Giselle, Carlos, Juan Carlos, Daniela, Gloria, Christian, José, Fernando, Andrés, Bety e Irak por otorgarme siempre, su apoyo incondicional.

A mis amigas Peri, Karla, Adriana, Verónica, Elsa, Yessenia, Liliana, Mari Jose, Maripili, Viviana, Ana y Yadis.

A mis amigos Osvaldo, Rodolfo, Israel, Bernardo, Chucho y Olrik.

A todos, ¡¡muchas gracias!!

# Índice

|  | Pág. |
|--|------|
| <b>RESUMEN</b>   | 5    |
| <b>INTRODUCCIÓN.</b>   |      |
| <b>Generalidades sobre las levaduras</b>                               | 6    |
| <b>El transporte de iones</b>  | 7    |
| <b>El transporte del potasio</b>                                       | 8    |
| <b>Proteínas involucradas en el transporte de K<sup>+</sup>.</b>       |      |
| Trk1p y Trk2p (Transportadores de K <sup>+</sup> )                     | 10   |
| Kha1p (antiportador K <sup>+</sup> /H <sup>+</sup> )                   | 11   |
| Nha1p (antiportador Na <sup>+</sup> ó K <sup>+</sup> /H <sup>+</sup> ) | 13   |
| Nhx1p (antiportador Na <sup>+</sup> ó K <sup>+</sup> /H <sup>+</sup> ) | 14   |
| <b>El pH extracelular</b>  | 15   |
| <b>El pH intracelular</b>  | 15   |
| <b>JUSTIFICACIÓN.</b>  | 17   |
| <b>HIPÓTESIS.</b>  | 18   |
| <b>OBJETIVO.</b>   | 19   |
| <b>Objetivo General</b>  |      |
| <b>Objetivos Específicos</b>   |      |
| <b>MATERIALES Y METODOS.</b>   | 20   |
| <b>Cepas</b>   | 20   |
| <b>Medios de cultivo</b>   | 20   |

|   |    |
|---|----|
| <b>Reactivos concentrados</b>                             | 21 |
| <b>Mutantes:</b>  |    |
| <b>Construcción de módulos recombinantes</b>              | 21 |
| PCR para construcción de módulos transformantes           | 22 |
| <b>Construcción de las mutantes.</b>                      |    |
| Preparación de células competentes y transformación       | 23 |
| <br>  |    |
| <b>Verificación preliminar de las mutantes.</b>           | 23 |
| Mutante simple: $\Delta kha1$                             | 24 |
| Mutante simple: $\Delta nha1$                             | 24 |
| Mutante simple: $\Delta nhx1$                             | 24 |
| Mutante doble: $\Delta kha1-\Delta nha1$                  | 24 |
| Mutante doble: $\Delta nhx1-\Delta kha1$                  | 25 |
| <br>  |    |
| <b>Extracción del DNA total</b>                           | 25 |
| <b>Comprobación genética de las mutantes construidas</b>  | 26 |
| <br>  |    |
| <b>Caracterización de las mutantes.</b>                   |    |
| Crecimiento celular                                       | 26 |
| Determinación de potasio intracelular                     | 26 |
| Medida del transporte de potasio y del pH extracelular    | 27 |
| Cambios del pH intracelular                               | 27 |
| Estimación del potencial de membrana                      | 28 |
| Purificación de la membrana plasmática                    | 29 |
| Actividad de hidrólisis de ATP de la membrana plasmática. | 29 |
| Consumo de oxígeno  | 30 |
| <br>  |    |
| <b>RESULTADOS</b>   | 31 |
| <br>  |    |
| <b>DISCUSIÓN</b>  | 55 |
| <br>  |    |
| <b>CONCLUSIONES</b>                                       | 65 |

**PERSPECTIVAS**

66

**BIBLIOGRAFÍA.**

67

**Libros y Artículos**

**Sitios de WWW**

## RESUMEN

En la levadura, el  $K^+$  entra a través de dos proteínas, descritas como de alta y baja afinidad, Trk1p y Trk2p, respectivamente. Además, se ha propuesto que la salida de  $K^+$  está mediada por un canal iónico de  $K^+$  (Tok1p), y dos antiportadores (Kha1p y Nha1p). Se ha encontrado otro antiportador  $K^+/H^+$ , Nhx1p, que pudiera permitir a la vacuola almacenar grandes concentraciones de  $K^+$ . Dado que la regulación del pH intracelular puede estar relacionada con el funcionamiento de todas estas proteínas, se estudiaron mutantes simples o combinadas en estos sistemas, empleando dos cepas con diferente fondo genético (FY833 y BY4742), para definir el papel de los intercambiadores, tanto en el transporte y acumulación del  $K^+$ , como en la regulación del pH interno de la célula.

Encontramos que los genes que codifican para estos intercambiadores catión/ $H^+$  no son esenciales para la célula; al parecer, juegan un papel secundario, o bien concertado, tanto en la dinámica del transporte de  $K^+$ , como de la regulación del pH intracelular.

Las mutaciones simples o combinadas de Kha1p y Nhx1p (en particular la doble), aumentaron la acumulación de  $K^+$  así como la actividad de la  $H^+$ -ATPasa, que pudiera favorecer el aumento en el transporte de  $K^+$  hacia el interior.

Un efecto aparentemente adicional de la eliminación de los distintos genes, además presente en ambos fondos genéticos, fue un aumento en la actividad respiratoria al eliminar Kha1p o Nhx1p, y una disminución al eliminar Nha1p. La combinación de ellas produjo un estado intermedio, con predominio del efecto positivo de la eliminación de Kha1p.

Por ahora, es difícil explicar la correlación fisiológica de la ausencia de estos genes y los cambios en la respiración de sus mutantes.

## INTRODUCCIÓN.

### Generalidades sobre las levaduras.

*Saccharomyces spp.* es un hongo unicelular, utilizado principalmente en la elaboración del pan, cerveza, vinos y otros productos fermentados, así como el alcohol mismo. Este género 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* tiene cuatro especies: *S. bayanus*, *S. cerevisiae*, *S. paradoxus* y *S. pastorianus* (Broach *et al.*, 1991, Vaughan-Martini, *et al.* 1993; Walker, 1998, Gustafsson, 1976; Ramos, 1999).

El primer genoma secuenciado de un eucarionte fue el de *Saccharomyces cerevisiae*, publicado en 1996 (Goffeau, *et al.* 1996); tiene 12.1 Mb (equivalente a cuatro milésimas del tamaño del genoma humano), y alrededor de 6200 genes, así como 16 cromosomas. Sólo para el 65% de ellos se conocen o presuponen las proteínas que codifican y su función fisiológica (Broach, *et al.* 1991; Goffeau, *et al.* 1996; Entian, *et al.* 1999; Lewin, 2000).

El mecanismo de transformación de energía de *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, Kwast *et al.*, 2002). Puede utilizar como fuente de carbono azúcares simples, aminoácidos, polioles, ácidos grasos, alcoholes alifáticos, componentes hidrocarbonados, y varios compuestos heterocíclicos y poliméricos (Walker, 1998).

*S. cerevisiae* obtiene su energía principalmente de la glucólisis. Esta vía es de las más conservadas, presente en todos los microorganismos procariontes y eucariontes, además de ser de las más rápidas (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 aeróbicas se producen 38 moléculas de ATP por cada molécula de glucosa degradada hasta CO<sub>2</sub> y H<sub>2</sub>O (Nicholls, 1987; Peña y Dreyfus, 1990; Arnold, 1998; Wang y Oster, 1998, Yasuda, 1998; Peña, 2000; Nelson y Cox, 2000).

### **El transporte de iones.**

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

El estudio del transporte de iones a través de la membrana plasmática de *S. cerevisiae*, se inició con los trabajos de 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 sólo después de ser propuesta la hipótesis (actualmente teoría) quimiosmótica de Mitchell (1961), se logró entender la bioenergética de los sistemas de transporte de los iones (Peña *et al.*, 1972; Nicholls, 1987; Garland, 1992).

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, mientras, Saier *et al.* (1998) propusieron una forma de ordenar los presuntos transportadores de *S. cerevisiae*, organizando a los 258 genes conocidos hasta ese momento en 42 familias, bajo un criterio filogenético (evolutivo), y un criterio de especificidad por el sustrato (bioquímico).

De acuerdo con la teoría de Mitchell (1968) los transportadores mueven solutos siguiendo el sentido de los potenciales electroquímicos existentes a través de la membrana (Peña, 1975; Nicholls, 1987). El transporte de iones puede ser primario o secundario, el primario se refiere al realizado por proteínas de membrana conectadas directamente a una fuente de energía, como el ATP, la luz o el poder reductor (Mitchell, 1961; 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). El transporte secundario se encuentra estrictamente acoplado a la actividad realizada por el transporte primario, encontrando así al transporte de un solo ion (uniporte); el transporte de dos en la misma dirección (simporte o cotransporte); o el transporte de iones en dirección opuesta (antiportador). Si este transporte no transfiere carga neta a través de la membrana, se denomina electroneutro, pero si la transfiere sería electrogénico (Nicholls, 1987; Peña y Dreyfus, 1990; Nelson y Cox, 2000, Hauser *et al.* 2001).

### **El transporte del potasio.**

El potasio es el catión monovalente mas abundante en las células, y el principal determinante de parámetros fisiológicos (Ko, *et al.* 1990; Fairman, *et al.* 1999), como el

volumen celular, la fuerza iónica, la turgencia y parámetros enzimáticos (Hirokawa, 2002; Ramakrishnan, 2002); También se han registrado cambios en el metabolismo de la levadura por la acción del potasio (Lasnitski y Sorényi, 1935; Pulver y Verzar, 1940; Conway y O'Malley, 1946; Rothstein, *et al.* 1946; Rothstein, *et al.*, 1953; Rothstein y Bruce, 1958; Rothstein, 1974). Mientras que enzimas como la piruvato cinasa, fosfofructocinasa y acetaldehído deshidrogenasa cambian su actividad por la presencia de  $K^+$  en el medio (Gaber, *et al.* 1988, Rothstein y Enns, 1946).

En la levadura, el transporte de  $K^+$  es de tipo secundario; para entrar a la célula necesita de energía (Peña *et al.*, 1972; Peña, 1975), suministrada de forma indirecta por el transporte primario. El transporte primario corre a cargo de una P-ATPasa (Pma1p), distribuida en la membrana plasmática, constituyendo aproximadamente el 10% del total de las proteínas de la membrana. *PMA1* está en el cromosoma VII y codifica para una proteína de 99.61 KDa, (<http://genome-www4.stanford.edu/cgi-bin/SGD/locus.pl?locus=pma1>; Miranda *et al.*, 2002). Esta P-ATPasa es sensible al vanadato y al dietilestilbestrol. La ablación del gene es letal para la célula (Serrano *et al.*, 1986, Miranda, *et al.*, 1995; Miranda, *et al.*, 2002).

Pma1p hidroliza al ATP para bombear  $H^+$  al medio extracelular, y genera así una diferencia de potencial electroquímico, negativo en el interior citosólico (Mitchell, 1961; Peña *et al.*, 1972; Peña, 1975; Peña *et al.*, 1984) que es aprovechado por la levadura para transportar  $K^+$  y otros sustratos ( $Na^+$ , glucosa, galactosa, aminoácidos, etc.) 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; Ramos, 1999).

Se ha observado que alrededor de dos tercios del  $K^+$  transportado al interior celular 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 han reportado 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; Bertl, *et al.* 1998; Fairman, *et al.* 1999; <http://genome-www4.stanford.edu/cgi-bin/SGD/locus.pl?locus=tok1>). Se han propuesto también dos antiportadores  $M^+/H^+$ , 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 $K^+$ .**

#### **Uniportadores**

##### **Trk1p y Trk2p.**

Ambos transportadores, pertenecen a la familia TRK, característica de algunos hongos unicelulares (Calero, *et al.* 1998). Trk1p se ha descrito como un transportador de  $K^+$  de alta afinidad, con una  $K_m$  de 24  $\mu M$  y una  $V_{max}$  de 30 nmol/mg/min (Rodríguez Navarro y Ramos, 1984; Ramos, 1999).

Trk2p, a diferencia del primero, presenta una afinidad de 2 mM y una muy baja  $V_{max}$  de 7 nmol/mg/min (Rodríguez-Navarro y Ramos, 1984; Ramos *et al.*, 1985; Ko *et al.*, 1990; Ramos *et al.*, 1994; Ramos, 1999).

Haro y Rodríguez-Navarro (2002) proponen que Trk1p es un homodímero, que funciona como un co-uniportador, a través del cual 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).

## **Antiportadores Cation / H<sup>+</sup>**

Los antiportadores son una importante familia de proteínas presentes en las membranas de muchas células, desde humanas hasta bacterias; todos con la misma función, pero con una estructura primaria diversa (Orlowski y Grinstein, 1997; Counillon y Pouyssegur, 2000), que juegan un papel importante para el mantenimiento de cationes así como de la homeostasis del pH (Simon *et al.*, 2003).

### **Kha1p (antiportador K<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>)**

El gene se localiza en el cromosoma X de *S. cerevisiae*, y su proteína tiene 873 residuos de aminoácidos, con una masa molecular de 97 KDa; su ablación 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<sup>+</sup>, pero nunca identificaron a la proteína. Peña y Ramírez (1991) describieron una salida de K<sup>+</sup> de la levadura dependiente de energía. Ramírez *et al.* (1998) describieron la presencia de un sistema antiportador K<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> presente en la membrana plasmática; caracterizaron el gene *YJL094c* del genoma de *S. cerevisiae*, proponiendo que codifica para un antiportador K<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>, que denominaron *KHA1*. Propusieron que Kha1p cumple un papel importante en la regulación del K<sup>+</sup> intracelular, así como en la regulación del pH intracelular.

### **Nha1p (antiportador Na<sup>+</sup> o K<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>)**

El gene se localiza en el cromosoma XII; su producto tiene 985 aminoácidos, con una masa molecular de 109 KDa. Su ablación no es letal para la célula (Prior, *et al.*, 1996; <http://genome-www4.stanford.edu/cgi-bin/SGD/locus.pl?locus=nha1>); se localiza en la membrana plasmática (Bañuelos *et al.*, 2002); se caracterizó como un transportador de Na<sup>+</sup>, y presenta una alta similitud con el gene *Sod2* de *Schizosaccharomyces pombe* y con el Z-

Sod2 de *Zigosaccharomyces rouxii*. Su sobreexpresión causa resistencia al  $\text{Na}^+$  y  $\text{Li}^+$ , mientras que su ablación ocasiona una mayor sensibilidad a la presencia de estos iones en el medio (Prior *et al.*, 1996). Bañuelos *et al.*, (2002) proponen que el antiportador también participa en la salida del  $\text{K}^+$  intracelular. Además, Simon *et al.* (2003) afirman que el extremo carboxilo terminal de Nha1p en una región importante de la proteína que participa en la regulación del ciclo celular de la levadura.

### **Nhx1p (antiportador $\text{Na}^+$ o $\text{K}^+/\text{H}^+$ ).**

El gene se localiza en el cromosoma IV; el producto polipeptídico tiene 633 residuos de aminoácidos, con una masa molecular de 70.1 KDa. La ablación de este gene no es letal para la célula (Nass, *et al.*, 1997; <http://db.yeastgenome.org/cgi-bin/SGD/locus.pl?locus=nhx1>).

Nhx1p pertenece a la familia NHE (intercambiador  $\text{H}^+/\text{Na}^+$ ) que se encuentra ampliamente distribuida en la naturaleza, desde procariontes hasta eucariontes (Venema *et al.* 2003). Esta familia de antiportadores se subdivide en dos, los que se localizan preferentemente en la membrana plasmática y los que se dirigen a membranas internas celulares; en este último grupo se localiza Nhx1p (Brett *et al.*, 2002). El sitio que se ha propuesto para su función ha sido variable, ya que Nhx1p de plantas, colocaliza bastante bien en la vacuola, Nhx1p de hongos (*S. cerevisiae*) colocaliza, según Rao en vesículas prevacuolares (endosomas) (Brett, *et al.* 2002), mientras que Mazayuki Numata la propone en mitocondria (Numata, *et al.* 1998).

Se ha propuesto que Nhx1p forma un complejo con Gyp6p. Dicho complejo colocaliza en los endosomas y la participación de Nhx1p es regular el pH intraorganelar. Se ha

observado que dependiendo de la concentración de H<sup>+</sup> del interior del organelo, este regresará al aparato de Golgi o migrará a la vacuola (Ali, M., *et al.* 2004).

### El pH extracelular.

El pH extracelular afecta la velocidad de la fermentación (Rothstein y Demis, 1959; Peña *et al.*, 1972), el crecimiento celular, la fisiología, y la diferenciación celular (Bearson, S. *et al.* 1997). El estrés producido por la alcalinización del medio extracelular afecta la expresión de 71 genes, entre los cuales se encuentran dos ATPasas, una es ENA1 (bomba de Na<sup>+</sup>, de la membrana plasmática) y la otra es VMA4 (bomba de H<sup>+</sup> vacuolar) (Lamb *et al.*, 2001) Ver tabla 1.

**Tabla 1.** Genes activados por estrés de alcalinización del medio extracelular

|   |  |
|---|--|
| Depleción de Fosfato                              | <i>PHO11, PHO12, PHO84, SPL2</i>   |
| Depleción de Fe <sup>2+</sup> / Cu <sup>2+</sup>  | <i>ARN3/SIT1, ARN4/ENB1, CTR3, FET3, FET4, FRE1, FRE3, FRE4.</i>   |
| Proteínas secretadas, de membrana o pared celular | <i>ENA1, PRY2, SVS1, YAL027W, YAR068W, YAR068W, YBL111C, YHL111C, YHR214W-A, YIL117C, YLL044W, YOL154W, YOR382W, YOR383C.</i>  |
| Vacuola   | <i>NRF1, PHM2, VMA4, VPS21, YJL012C.</i>   |
| Reguladores                                       | <i>DEP1, NRG2, PIG1, SMK1, TEPI, TIS11, YDL214C.</i>   |
| Transporte  | <i>GAP1, HXT2, YNR070W.</i>  |
| Biosíntesis y metabolismo                         | <i>ATP10, BIO4, ISU2, LEU2, URA1.</i>  |
| Respuesta a estrés general                        | <i>GRE1</i>  |
| Otros   | <i>BBP1, CDC46, MTL1, NFII, YBR094W, YBR134W, YBR178W, YCR072C, YGR136W, YGR146C, YIL169C, YKR033C, YLR339C, YLR385C, YLR402W, YMR122C, YNL017C, YNL208W, YNL218W, YNL226W, YNL313C, YNR061C, YOR225W, YPL047W, YPL062W.</i> |

Adaptada de Lamb *et al.*, 2001.

## **El pH intracelular.**

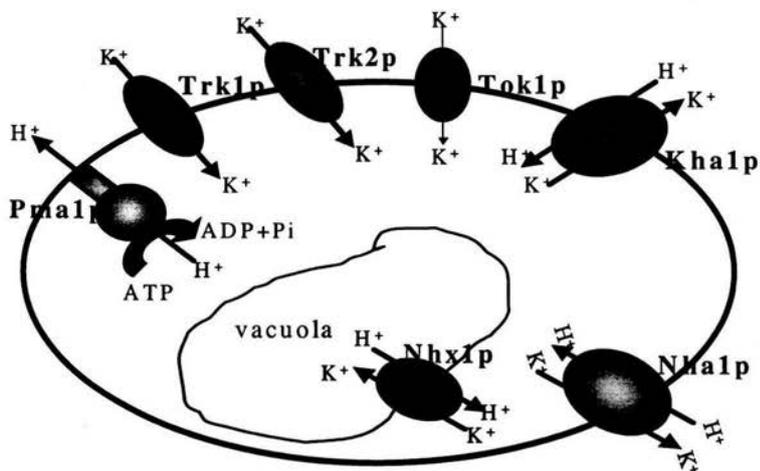
Existen varios mecanismos que se han implicado en la regulación del pH intracelular, representados por varios sistemas de transporte ligados al ciclo de  $H^+$ . El pH intracelular ha sido estudiado por diversos grupos de investigación, entre ellos el de Conway y cols. (1950), quienes emplearon una técnica en la que no se podía diferenciar entre los valores del pH citoplásmico y el organelar. Slavik (1985), propuso el empleo de colorantes fluorescentes hidrosolubles como indicadores del pH interno de la célula, pero que tardan en difundir al interior celular. Kano y Fendler (1978), introdujeron la piranina (ácido 8-hidroxi-1,3,6 pireno trisulfónico) a liposomas, logrando detectar cambios en la fluorescencia de este compuesto debido a las modificaciones del pH interno, que se deben a cambios en la protonación del grupo OH ionizable del compuesto, y que son directamente proporcionales al valor de pH entre 5.5 y 8.5. Peña *et al.* (1995), mediante electroporación, introdujeron la piranina en las levaduras, observando que el compuesto se localiza en el citoplasma y no en otros compartimentos celulares (tales como la vacuola). También se demostró que es posible medir los cambios en el pH citoplásmico, y también del vacuolar, siguiendo los cambios en la fluorescencia de dicho fluoróforo (Calahorra, *et al.* 1998).

A partir de investigaciones en varios organismos, se ha propuesto que las fluctuaciones del pH intracelular desempeñan un papel regulador durante el ciclo celular. Por ejemplo, el incremento del éxito reproductivo está directamente relacionado con el aumento del pH interno del ovocito de erizo de mar, para que se pueda llevar a cabo la fertilización (Johnson y Epel, 1976) y la estimulación mitogénica en células de mamífero (Schuldiner y Rozengurt, 1982). En las levaduras se ha propuesto que este pH interno activa el cambio de las células dentro del ciclo celular el sitio "start" (Anand y Prasad, 1989).

En *S. cerevisiae*, el pH intracelular se encuentra entre 5.8 y 7.4, dependiendo en parte de los cambios en el pH extracelular (Ryan y Ryan, 1972), que puede llegar a variar entre 8.0 y menos de 3.0 (Carmelo, *et al.* 1998). Los cambios internos observados del pH se pueden explicar de diferentes maneras (Rothstein y Demis, 1958), pero la actividad de la P-ATPasa (Pma1p), parece ser uno de los principales factores que los promueven. La acidificación del medio extracelular es llevado a cabo por Pma1p; su actividad produce una alcalinización del interior que debe ser compensada por la acción de otros sistemas que recuperen hacia el interior parte de los H<sup>+</sup> expulsados (antiportadores M<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>, como Kha1p y Nha1p), o bien por la expulsión de aniones (Peña *et al.*, 1972). La presencia de ácidos débiles en el interior celular, tales como el ácido carbónico, también participan en la regulación del pH intracelular (López, *et al.* 1999).

Se ha propuesto a la vacuola como un organelo clave para la regulación del pH citoplásmico en las levaduras; Carmelo, *et al.* (1997) incubaron células de levadura en un medio con pH de 3.5, y observaron que el pH vacuolar se mantiene dentro de un margen de 5.4-5.5, mientras que el citoplásmico se encuentra entre 6.0-6.5. Esta regulación indica que hay un sistema complejo que mantiene la homeostasis iónica dentro de márgenes estrechos.

Entre los mecanismos de regulación propuestos se encuentra una proteína con actividad de antiportador de Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> denominado *Nhx1p*. Esta proteína, además de regular la osmolaridad celular, ayuda al mantenimiento del pH citoplásmico, moviendo Na<sup>+</sup> al interior de los compartimentos prevacuolares, en un intercambio con H<sup>+</sup> del citoplasma (Nass y Rao, 1998).



**Figura 1. Modelo Propuesto para el transporte de potasio en *S. cerevisiae*.** En esta figura se muestran algunas de las proteínas de la membrana plasmática relacionadas con el transporte de potasio y la regulación del pH intracelular. Trk1p y Trk2p son transportadores de  $K^+$ , tanto de alta como de baja afinidad (respectivamente), Nha1p y Kha1p son antiportadores catión/ $H^+$ , que se presumen presentes en la membrana plasmática. Tok1p es un canal de  $K^+$  rectificador saliente, propuesto como uno de los responsables del transporte de  $K^+$  hacia fuera de la célula. En vesículas prevacuolares y posiblemente también en la vacuola se localiza un tercer antiportador catión /  $H^+$  denominado Nhx1p.

## JUSTIFICACIÓN.

*S. cerevisiae* es la levadura mas estudiada; se tiene la secuencia de todo su genoma y una gran información sobre su fisiología, metabolismo, biología molecular y filogenética. Es un excelente modelo biológico para investigaciones básicas y biotecnológicas.

Trabajos previos han permitido identificar dos uniportadores del  $K^+$ , mientras que su salida se ha referido a la acción de dos antiportadores  $H^+/K^+$ , denominados Kha1p y Nha1p, además del Nhx1p en la vacuola, estableciéndose a esta última, como un organelo importante para la regulación del  $K^+$  y del pH.

El  $K^+$  participa en el control del volumen celular, la turgencia, la fuerza iónica y la presión osmótica. El estudio de las interacciones de los sistemas de entrada y salida de este catión puede permitir definir los mecanismos de regulación o cambio del pH intracelular y la homeostasis del potasio, tanto para los organelos, como para el citoplasma. Debido a que la levadura es un organismo fácil de manipular genéticamente es posible mutar o eliminar especialmente los genes de los antiportadores  $H^+/K^+$  implicados en el transporte del  $K^+$  para intentar conocer sus funciones simultáneas con mayor detalle.

## **HIPÓTESIS.**

Los tres antiportadores catión / H<sup>+</sup> (KHA1, NHA1 y NHX1) son proteínas necesarias y esenciales tanto para la regulación del pH intracelular como para el mantenimiento de la concentración de potasio interno en *Saccharomyces cerevisiae*.

## OBJETIVOS.

### Objetivo General.

Caracterizar el papel de los antiportadores Kha1p, Nha1p y Nhx1p en la entrada y salida del  $K^+$  y su papel en la regulación del pH intracelular de *Saccharomyces cerevisiae*.

### Objetivos Específicos.

Obtener mutantes simples y múltiples sin los genes *KHAI*, *NHAI* y *NHXI*.

Caracterizar el transporte de  $K^+$  en cada una de las mutantes construidas.

Medir la concentración de  $K^+$  intracelular para cada una de las cepas mutantes estudiadas.

Medir el pH intracelular de cada una de las mutantes estudiadas.

Medir el potencial de membrana de cada una de las mutantes estudiadas.

Medir la actividad la capacidad de acidificación del medio extracelular de cada una de las mutantes estudiadas.

## MATERIALES Y METODOS.

### Cepas.

Para este trabajo se emplearon la cepa FY833 (MATa, *his3Δ200*, *ura3-52*, *leu2Δ1*, *lys2Δ202*, *trp1Δ63*, *GAL2<sup>+</sup>*) de *S. cerevisiae*, donada por la Dra. Mónica Montero de la Universidad Federal de Río de Janeiro, Brasil. La cepa BY4742 y su mutante (*matα*, *his3Δ1*, *leu2Δ0*, *lys 2Δ0*, *ura3Δ0*) y *Δnhx1::Kan<sup>R</sup>*, donadas por la Dra. Rajini Rao, de la Universidad Johns Hopkins, en Baltimore.

### Medios de cultivo.

Salvo donde se indica, se utilizó YPD (peptona de gelatina 1%, extracto de levadura 1 %, glucosa 2 %, suplementado con 120 mg/l de uracilo y 40 mg/l de adenina) para el medio líquido, y la misma composición más Agar al 2 % para el medio sólido.

Para obtener las células de las que se obtuvieron las mitocondrias, se utilizó Yelac (extracto de levadura 1 %, ácido láctico 2 %,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.1 %,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  0.12 %, NaOH 5 g/l, todo disuelto y ajustado el pH a 5) como medio líquido.

Medio Selectivo: (SD) compuesto por Yeast nitrogen base, 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/lit, más agar al 2% (medio sólido). Los medios se esterilizaron por 15 min a 121 °C con una presión de 1 Kg/cm<sup>2</sup>.

## **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 2 M; CaCl<sub>2</sub> 10 mM; CTAB (Cetiltrimetilamonio, bromuro) 200 mM; HCl 1 N; ácido propiónico 50%; NH<sub>4</sub>OH 2 N; piranina 100 mM; CCCP (Carbonilcianuro *m*-clorofenilhidrazona) 10 mM; DiSC<sub>3</sub>(3) (3,3'-dipropiltiacarbocianina) 0.1 mM.

## **Obtención de las mutantes:**

### **Construcción de Módulos Recombinantes: marcadores de auxotrofia *TRP1* e *HIS5*<sup>+</sup>.**

La construcción de los módulos recombinantes se hizo de acuerdo con los métodos de Longtine *et al.* (1998), quienes describen un conjunto de plásmidos que sirven de templatado para amplificar por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), los módulos de los genes *TRP1* e *HIS5*<sup>+</sup>, a los que se les puede agregar en los extremos, secuencias homólogas para los genes que se desea eliminar. Una ventaja de estos módulos es que, con excepción del módulo para *TRP1* que es de *S. cerevisiae*, *HIS5*<sup>+</sup> es un gene ortólogo de *S. pombe*, que elimina la posibilidad de recombinación consigo mismo y no con la región que se desea eliminar. Además, estos módulos contienen una secuencia conservada de 20 pb en sus extremos que permite amplificarlos.

Para amplificar cada uno de los módulos, se diseñaron oligonucleotidos de 60 pb, que contenían en su extremo 5' una secuencia de 40 pb correspondiente al extremo 5' del gene blanco que sería eliminado, mas 20 pb de la secuencia de los módulos (oligonucleotidos "F"). De igual manera, se diseñaron oligonucleotidos en la secuencia complementaria (extremo 3') del gene que se desea eliminar (oligonucleótidos "R"). Ver tabla 2. Con estos

oligonucleotidos se realizaron PCRs para amplificar cada uno de los módulos recombinantes.

Tabla 2. Oligonucleótidos para amplificar el módulo

| Oligonucleótido | Secuencia del gene   | Secuencia del módulo     |
|-----------------|--|--------------------------|
| FNHA1           | (-14) 5'-CTTAGCTAGATATTATGGCTATCTGGGAGCAACTAGAAAGT (26)      | CGGATCCCCGGGTTAATTAAC-3' |
| RNHA1           | (3058) 5'-CCCTTCTTTACCGCATCTACTCTATTTCGGACACATGTA<br>(3018)  | GAATTCGAGCTCGTTTAAAC-3'  |
| FKHA1           | (1) 5'-ATGGCAAACACTGTAGGAGGAATTCTGTCTGGGTGTAATC (40)         | CGGATCCCCGGGTTAATTAAC-3' |
| RKHA1           | (2693) 5'-AAATTAAGAACAAGAAAATTAATAAAATTTCTGCTGATAC<br>(2653) | GAATTCGAGCTCGTTTAAAC-3'  |

En esta tabla se muestran las secuencias de los diferentes oligonucleótidos "F" y "R" de 60nt de longitud, que fueron seleccionados para construir los módulos recombinantes para los genes *NHA1* y *KHA1*.

#### PCR para la construcción de los módulos recombinantes.

Con los oligonucleótidos obtenidos se amplificaron por PCR los módulos correspondientes, utilizando el Kit Expand High Fidelity PCR system de ROCHE<sup>®</sup>, y un termociclador COY II. Se utilizaron los reactivos del Kit, mezcla de dNTPs 10 mM, oligonucleotidos (R y F) 200 nmoles/μl, y DNA de los plásmidos con los módulos (100 ng). El programa fue el siguiente: 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.

Los productos de PCR que se obtuvieron se verificaron en un gel de agarosa al 1% y se purificaron empleando el Kit QIAGEN<sup>®</sup> PCR purification. El DNA purificado se concentró en una centrífuga de vacío (SPEED-VAC<sup>®</sup>).

## **Construcción de las mutantes.**

### **Preparación de células competentes y transformación.**

Para obtener las células competentes se empleó un matraz de 10 ml de medio YPD que se inoculó con la cepa correspondiente y se incubó por 18 h a 30 °C con agitación constante (250 rpm). Se tomó una alícuota del cultivo y se determinó su densidad óptica a 600 nm en un espectrofotómetro *Shimadzu*, 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 llegar a una densidad óptica de 0.5 a 0.6 U a 600 nm. Las células se lavaron con 50 ml de agua destilada estéril, se resuspendieron en un ml de agua destilada estéril, se transfirieron a un tubo de 1.5 ml y se centrifugaron por 10 seg. El paquete celular se lavó con 1.0 ml de acetato de litio 100 mM, TE (Tris 10 mM - EDTA 1 mM a un pH 7.5), se centrifugó, y finalmente el paquete celular se resuspendió en 500  $\mu$ l de la mezcla de acetato de litio-TE.

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

## **Verificación preliminar de las mutantes.**

### **Mutante simple: $\Delta kha1$ .**

Para la construcción de esta mutante, se utilizó la cepa FY833 ((MATa, *his3* $\Delta$ 200, *ura3-52*, *leu2* $\Delta$ 1, *lys2* $\Delta$ 202, *trp1* $\Delta$ 63, *GAL2*<sup>+</sup>). La cepa silvestre FY833 se transformó empleando los módulos de *TRP1* e *HIS5*<sup>+</sup>. Ambas ablaciones ( $\Delta kha1::TRP1$  y  $\Delta kha1::HIS5$ <sup>+</sup>), se seleccionaron en cajas SD-*trp*<sup>-</sup> y SD-*his*<sup>-</sup>, respectivamente.

### **Mutante simple: $\Delta nha1$ .**

La ablación de este gene se hizo en el fondo genético FY833, empleando el módulo *HIS5*<sup>+</sup>. La selección se realizó en cajas con medio selectivo SD-*His*<sup>-</sup>.

### **Mutante simple: $\Delta nhx1$ .**

La mutante simple de este gene ( $\Delta nhx1::KAN^R$ ) fue donada por la Dra. Rajini Rao. Su comprobación parcial en nuestro laboratorio se realizó creciéndola en medio YPD + Geneticina 400  $\mu$ g/ml; más adelante se corrió un PCR donde se comprobó la ausencia de este gene de este fondo genético. El fondo genético de esta cepa es el de la cepa By4742.

### **Mutante doble: $\Delta kha1$ - $\Delta nha1$ .**

Para esta mutante se utilizó la cepa  $\Delta kha1::HIS5$ <sup>+</sup>, y sobre ella se eliminó el gene *NHA1*, utilizando el módulo *TRP1*. Esta doble mutante ( $\Delta kha1::HIS5$ <sup>+</sup>- $\Delta nha1::TRP1$ ), se seleccionó en medio SD-*Trp*<sup>-</sup>.

### **Mutante doble: $\Delta nhx1$ - $\Delta nha1$ .**

En el fondo genético  $\Delta nhx1::KAN^R$ , se eliminó el gene *NHA1*; utilizando el módulo *HIS5*<sup>+</sup>. Esta mutante doble  $\Delta nhx1::KAN^R$ - $\Delta nha1::HIS5$ <sup>+</sup>, se seleccionó en medio SD- *His*<sup>-</sup>.

### **Mutante doble: *Δnhx1-Δkha1*.**

Esta cepa se construyó empleando el módulo *HIS5<sup>+</sup>* para eliminar el gene *KHA1* del fondo genético *Δnhx1::Kan<sup>r</sup>*, por lo que este nuevo fondo genético se seleccionó en cajas SD-His<sup>-</sup>.

### **Extracción del DNA total.**

De las colonias estriadas en la caja de Petri con medio YPD, se colectó un paquete de células que se resuspendió en 50  $\mu$ l de agua destilada estéril. A esta suspensión se agregaron, 200  $\mu$ l de solución de lisis (2% de tritón X-100, 1% SDS, 100mM de NaCl, 10mM Tris-Cl (pH 8) y 1 mM de Na<sub>2</sub>EDTA). Posteriormente, se agregaron 200  $\mu$ 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  $\mu$ l de TE (Tris 25 mM y EDTA 1 mM a pH 8.0) y se centrifugó durante 5 min. en una microfuga. Se colectó la fase acuosa, a la que se agregó 1 ml de etanol absoluto frío (-20° C); la mezcla se homogeneizó suavemente por inversión y se centrifugó nuevamente por 2 min. El sobrenadante se desechó y al precipitado se agregaron 400  $\mu$ l de TE mas 10  $\mu$ l de RNAasa (Ribonucleasa I, 10 mg/ml), incubando nuevamente a 37 °C por 15 min. A la mezcla se le agregaron 10  $\mu$ l de acetato de amonio 4 M mas 1 ml de alcohol absoluto frío (-20 °C). Se homogeneizó suavemente y se centrifugó por 2 min. a la velocidad máxima de la micro centrifuga. El DNA ya purificado se resuspendió en 50  $\mu$ l 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 de 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 para 25 ciclos.

Para verificar la presencia de los módulos, utilizamos cualquiera de los oligonucleótidos F y R descritos en la tabla 1, ya que todos 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 *NHA1* y *KHA1*; la secuencia de los oligonucleotidos utilizados en este PCR, se muestran en la Tabla 3.

| Tabla 3. Secuencia de oligonucleótidos para comprobar la ablación de los genes <i>NHA1</i> y <i>KHA1</i> . |  |                            |
|--|--|----------------------------|
| Tipo de oligonucleótido  | Secuencia de los oligonucleótidos          | Tamaño del producto de PCR |
| Forward <i>NHA1</i>  | (1354) 5'-TTCCTACACACACCACC-3' (1371)      | 900pb                      |
| Reverse <i>NHA1</i>  | (2275) 5'-ATGGTCATTGTGGTAGTAAAC-3' (2254)  |                            |
| Forward <i>NHX1</i>  | (325) 5'-TCCCCGGGCATTATATT-3' (342)        | 703pb                      |
| Reverse <i>NHX1</i>  | (1028) 5'-TGGTGATCTGTGATCTTCTTG-3' (1008)  |                            |
| Forward <i>KHA1</i>  | (555) 5'-GGATAGAGCAGGTATCGTTGT-3' (575)    | 799pb                      |
| Reverse <i>KHA1</i>  | (1373) 5'- ATCTGCTGCACCATCATCTT -3' (1354) |                            |

Los diferentes oligonucleótidos se diseñaron por un programa especial, eligiéndose sólo aquellos que presentaban una  $T_m$  baja.

## **Caracterización de las mutantes.**

### **Crecimiento celular.**

Para 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  $\mu$ l de cada cultivo y se determinó el número de células con un hemocitómetro de Neubauer. A partir de cultivos se inocularon matraces con 50,000 células/ml, incubando 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 a razón de 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 del potasio intracelular.**

El contenido de potasio se midió en las células ayunadas y sin ayunar. A 50 mg de células (100  $\mu$ l) se les agregaron 900  $\mu$ l de CTAB 200  $\mu$ M y se incubaron por 15 minutos; 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, calibrado a 0 con agua desionizada y a 100 con una solución de KCl 1 mM.

### **Medida del transporte de potasio y del pH extracelular.**

Los cambios en la concentración de potasio y de pH en el medio se siguieron con un electrodo selectivo, conectado a un potenciómetro Beckman Selection 2000, acoplado a un sistema de registro (computadora) elaborado por los Ings. Wilfredo Martínez Payán, Ignacio Martínez (Centro de Instrumentos y Materiales, UNAM), Manuel Ortines y Aurey Galván (Instituto de Fisiología Celular, UNAM). En la celda 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. Se agregó glucosa 50 mM y se continuó el registro por 15 minutos. Los trazos se calibraron con una solución de KCl o HCl, agregando alícuotas a un medio sin células, con amortiguador MES-TEA pH 6.0, 2 mM, en un volumen total de 10 ml.

### **Cambios del pH intracelular.**

Las células ayunadas de cada cepa se electroporaron con piranina siguiendo el siguiente protocolo: Se colocaron 500  $\mu$ l de células (250 mg de levaduras) más 20  $\mu$ l de piranina 100 mM en una celda de 0.4 mm para electroporar, aplicando un pulso de 2 KV, 25  $\mu$ F y 200  $\Omega$  (pulsador Bio-Rad gene). Se lavó tres veces con H<sub>2</sub>O dd, centrifugando 20 seg a 14,000 rpm y descartando el sobrenadante. Al final de los lavados se resuspendió el paquete celular en agua, en su volumen inicial. De estas células se colocan 50  $\mu$ l (25 mg de levaduras) en una celda del fluorómetro que contiene amortiguador MES-TEA 2 mM, pH 6.0, para un volumen final de 2 ml; se inició el trazo de la fluorescencia a 460  $\rightarrow$  520 nm con la adición de las células. Pasados 60 seg, se agregó glucosa 50 mM y 2 min después, 50 mM de KCl. Al terminar cada trazo, se obtuvo el valor de la fluorescencia máxima, agregando 50  $\mu$ l de NH<sub>4</sub>OH 2 N, y para el valor de fluorescencia mínima se agregaron 50  $\mu$ l de ácido propiónico al 50%. Ambos valores se emplearon para calcular el pH intracelular con la ecuación de Henderson-Hasselbalch y las correcciones adecuadas (Calahorra *et al.*, 1998).

### **Estimación del potencial de membrana.**

El potencial de membrana se estimó empleando la 3,3'-dipropiltiacarbocianina (DiSC<sub>3</sub>(3)), que se distribuye siguiendo la formación del potencial de membrana (Peña *et al.*, 1984). Los cambios en la fluorescencia de este compuesto se siguieron a 540 nm de

excitación y 590 nm de emisión en un espectrofluorómetro SLM Aminco MDX1000. En una celda del fluorómetro, se agregó: CCCP 10  $\mu$ M,  $\text{CaCl}_2$  100  $\mu$ M, glucosa 50 mM, amortiguador MES-TEA 2 mM, pH 6.0, para un volumen final de 2 ml y 50  $\mu$ l de células (25 mg de levaduras), dejando transcurrir dos minutos. Pasados los dos minutos de incubación se agregó la cianina ( $\text{DiSC}_3(3)$ , 0.25  $\mu$ M), y posteriormente 50 mM de KCl.

### **Purificación de la membrana plasmática.**

Las células se crecieron en medio YPD durante 20 h a 30 °C y agitación constante; se cosecharon y lavaron con agua, centrifugando a 6,000 rpm por 5 minutos. El paquete de células se resuspendió en un amortiguador de sorbitol (sorbitol 1 M,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  50 mM, pH 7.4 ajustado con KOH), empleando 20 ml por cada 4 g de levadura más 20 ml de  $\beta$ -mercaptoetanol por cada 20 ml de amortiguador de sorbitol. La mezcla se incubó a 30 °C durante 10 minutos. Se añadió zimoliasa (500 unidades/g de levadura) y se incubaron las células por 60 minutos a 30 °C. La turbidez disminuyó al aumentar la digestión de la pared celular. Una vez parcialmente degradadas las paredes celulares, se les agregó PMSF (Phenylmethylsulfonyl fluoride, 1 mM), se sonicaron (potencia de 6 y 2 min) 15" con descansos de 15", cuatro veces en un sonicador Branson modelo 250. Se centrifugó el homogeneizado durante 10 minutos a 3,500 rpm, 4 °C, en un rotor SS-34 y se desechó el paquete celular; se centrifugó el sobrenadante por 30 minutos a 12,000 rpm, 4 °C, desechando el paquete celular; el sobrenadante se centrifugó a 18,000 rpm, 4 °C por 90 minutos, desechando paquete celular. Se ajustaron los sobrenadantes a 500 ml de Tris-EGTA (1 mM de EGTA-Tris, pH 7.2) y se centrifugó a 18,000 rpm, 4 °C por 90 minutos, desechando el sobrenadante. Los paquetes celulares se resuspendieron en Tris-EGTA mediante el empleo de un homogeneizador pequeño. Estos homogeneizados se

centrifugaron por 90 minutos a 18,000 rpm, 4 °C. El paquete celular se resuspendió en un pequeño volumen de Tris-EGTA. Las alícuotas se guardaron en tubos eppendorf a -70 °C.

#### **Actividad de hidrólisis de ATP de la membrana plasmática.**

Se midió la hidrólisis de ATP en el medio de reacción siguiente: PIPES-KOH 10 mM pH 7.0, ATP 5 mM, MgCl<sub>2</sub> 5 mM, PEP (Fosfoenol piruvato), azida de sodio 5 mM. La reacción se inició añadiendo las membranas plasmáticas purificadas (a una concentración conocida de proteína, medida por el método de Lowry) a un volumen final de 500 µl, donde se incubaron por 10 minutos a 30 °C. La reacción se detuvo añadiendo 100 µl de ácido tricloroacético (TCA) al 30 %. El fosfato liberado por la reacción se midió por el método de Sumner. Se tomó una alícuota de 400 µl de la muestra estándar o problema, y se ajustó a 2 ml con H<sub>2</sub>O; se agregó 250 µl de molibdato (Molibdato de amonio, 50 g/l) y se agitó, se adicionaron 250 µl de Elon (Metabisulfito de sodio, 30 g/l) y se agitó, incubandose por 10 minutos. Posteriormente se leyó en un espectrofotómetro Shimadzu UV-160A a 660nm.

#### **Consumo de Oxígeno.**

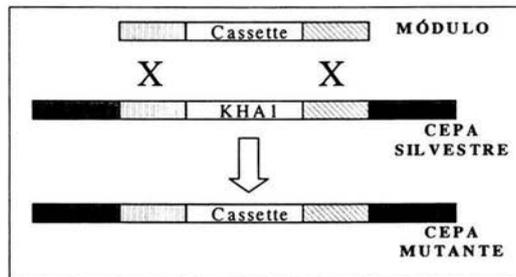
El consumo de oxígeno se cuantificó en una cámara con temperatura controlada (30 °C). Se registraron los cambios en la concentración de O<sub>2</sub> disuelto, mediante un electrodo de Clark, conectado a un monitor de oxígeno YSI (Yellow Springs Instrument) modelo 5300, acoplado a un sistema de registro (computadora) elaborado por los Ings. Wilfredo Martínez Payán, Ignacio Martínez, Manuel Ortines y Aurey Galván. En la cámara del instrumento se agregaron 3 ml de amortiguador MES-TEA 2 mM, pH 6.0, registrando una línea base de un minuto, se agregaron 40 mg de células/ ml y se continuó el registro por 4 minutos más. Se agregó etanol 21 mM y se continuó el registro por 15 minutos.

## RESULTADOS.

### Construcción de los módulos recombinantes.

Se construyeron los módulos *HIS5<sup>+</sup>* y *TRP1*, con extremos homólogos para los genes *KHA1*, *NHA1* y *NHX1* (Figura 2). Los módulos se amplificaron con los oligonucleótidos de la tabla 2, que reconocen una región complementaria constante del plásmido (pBM33). El tamaño de los módulos fue para el de *HIS5<sup>+</sup>* de 1403 pb mientras que para el de *TRP1* fue de 1036 pb.

Con estos módulos recombinantes se transformó la cepa FY833 y la mutante  $\Delta nhx1$  de BY4742. 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.

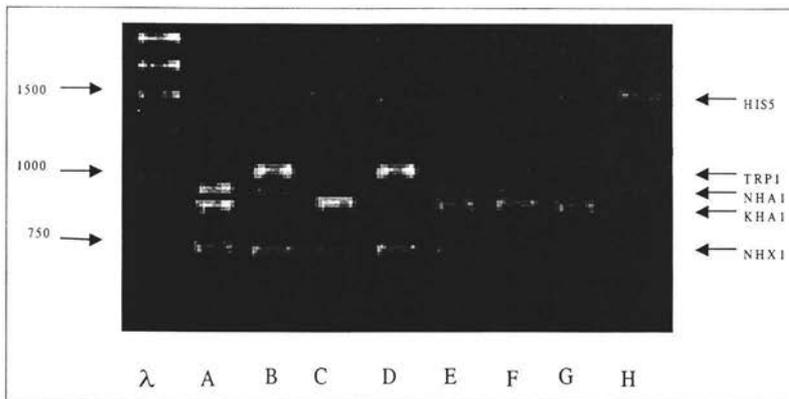


**Figura 2. Construcción de los módulos recombinantes.** Empleando como template al plásmido pBM33 para un PCR, se amplificó un módulo que contiene en sus extremos 5' y 3' regiones homólogas al gene que se desea eliminar. Por recombinación homóloga, a la cepa de estudio se le elimina el gene silvestre y en su lugar queda sólo nuestro módulo con un determinado marcador de auxotrofia.

### Verificación de los genotipos.

Las colonias seleccionadas de cada transformación se crecieron en cajas con los marcadores correspondientes de auxotrofia, para preverificar el genotipo, y sólo crecieron las colonias que contenían dentro de su genoma el gene adecuado para sobrevivir en ausencia del nutriente o en presencia del antibiótico. De forma simultánea se verificó la

viabilidad de las ablaciones de los genes *KHA1*, *NHA1* y *NHX1*. Así se obtuvieron las construcciones de las mutantes  $\Delta kha1$ ,  $\Delta nha1$ ,  $\Delta kha1\text{-}\Delta nha1$ ,  $\Delta nhx1\text{-}\Delta nha1$  y  $\Delta nhx1\text{-}\Delta nha1$



**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 799pb, para el gene *NHA1* es de 900pb y para el gene *NHX1* es de 703pb. El tamaño del producto de PCR para los módulos son: *TRP1* de 1036pb y para *HIS5<sup>+</sup>* de 1403pb. El carril **A**: FY833, **B**:  $\Delta kha1::TRP1$ , **C**:  $\Delta nha1::HIS5^+$ , **D**:  $\Delta kha1::HIS5^+ \Delta nha1::TRP1$ , **E**: BY4742, **F**:  $\Delta nhx1$ , **G**:  $\Delta nhx1 \Delta nha1::HIS5^+$ , **H**:  $\Delta nhx1 \Delta kha1::HIS5^+$  y  $\lambda$ : 250pb DNA Ladder.

Las seis cepas se sembraron en cajas con medio YPD para extraer el DNA total y realizar las reacciones de PCR, y así verificar que estas cepas no tuvieran los productos correspondientes de la región codificante de los genes eliminados, y sí los 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 (Ver figura 3). Los productos de PCR amplificados del DNA de las cepas silvestres Fy833 y BY4742 (carril A y E, respectivamente) son: un producto de 799 pb, que corresponde a la presencia del gene *KHA1*; un segundo producto de 900 pb que corresponde al gene de *NHA1* y un tercer

producto de 703 pb que corresponde a *NHX1*. A partir del DNA genómico de la cepa mutante  $\Delta kha1::TRP1$  (carril B), sólo se amplifican los fragmentos de los genes *NHA1* y *NHX1*, así como un producto que corresponde al módulo de *TRP1* de 1036 pb. Para la mutante  $\Delta nha1::HIS5^+$  (carril C) se amplificaron los fragmentos de *KHA1* de 799 pb, *NHX1* de 703 pb y el módulo de 1403 pb, que corresponde a *HIS5^+*. Para la doble mutante  $\Delta kha1::HIS5^+ \Delta nha1::TRP1$  (carril D) sólo se amplificaron los fragmentos que corresponden a los módulos *HIS5^+* y *TRP1* y el gene *NHX1*. En la mutante  $\Delta nhx1$  (carril F), se amplificaron los fragmentos de 799 y 900 pb de los genes *KHA1* y *NHA1*.

En la mutante  $\Delta nhx1 \Delta nha1::HIS5^+$  (carril G), sólo se amplificó el fragmento de *KHA1* de 799 pb y un amplificado, correspondientes al módulo *HIS5^+*. Y para la doble mutante  $\Delta nhx1 \Delta kha1::HIS5^+$  (carril H), sólo se amplificó el fragmento de *NHA1* de 900 pb y un amplificado, que corresponde al módulo *HIS5^+*.

De cada una de las mutantes obtenidas, se tomó una muestra del cultivo y se les colocó en glicerol para conservarlas a  $-70^\circ\text{C}$ , dentro de un criotubo.

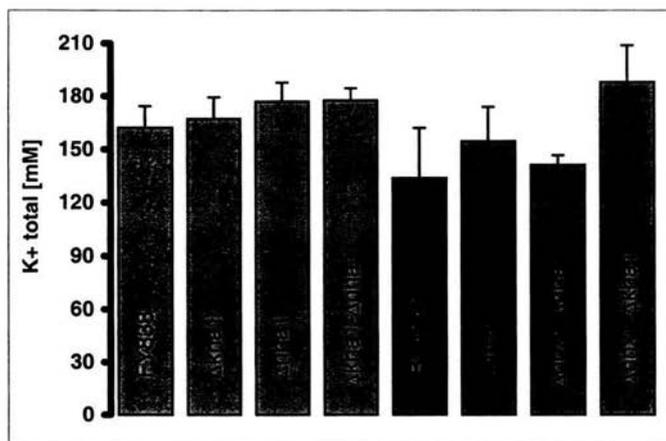
### **Caracterización fisiológica de las mutantes.**

#### **Crecimiento celular.**

Todas las mutantes obtenidas en este trabajo fueron viables y su rendimiento promedio fue de 2.0-2.3 g/200 ml de medio YPD complementado con uracilo y adenina (ver Materiales y Métodos).

### Determinación del potasio intracelular.

El contenido de potasio se midió en células ayunadas, empleando el detergente CTAB para romper las células y medir el  $K^+$  intracelular en el flamómetro. El contenido de  $K^+$  de las cepas obtenidas de FY833 no mostró ninguna variación en el contenido total de  $K^+$ , en comparación con su cepa silvestre (Figura 4).

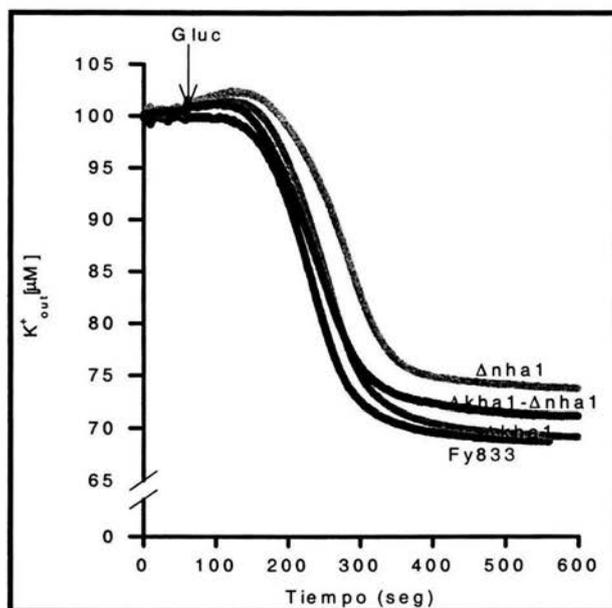


**Figura 4: Potasio intracelular de las distintas cepas.** Las células se crecieron en medio YPD durante 18 hr y se ayunaron 15 hr. El  $K^+$  se determinó incubando 50 mg de células en CTAB 200  $\mu$ M durante 15 minutos, centrifugando y diluyendo el sobrenadante 1:10 en agua. Las medidas se realizaron en un flamómetro Zeiss PF5. Se muestran las concentraciones y su desviación estándar.

En ausencia de *NHX1* del fondo genético BY4742 se observó un aumento no significativo en el contenido de  $K^+$  en la mutante, en relación con la silvestre. La eliminación simultánea de los genes de *NHX1* y *NHA1* parece no afectar la homeostasis del  $K^+$ , ya que su contenido intracelular es similar en cantidad al observado para BY4742 (Figura 4). Sin embargo, la diferencia aumentó cuando la mutación ( $\Delta nhx1$ ) se combinó con la supresión del gene *KHA1*, esta mutante acumuló 50 mM más que la concentración de este catión presente para su cepa silvestre y la cepa  $\Delta nhx1$ - $\Delta nha1$  (Figura 4).

## El transporte del potasio.

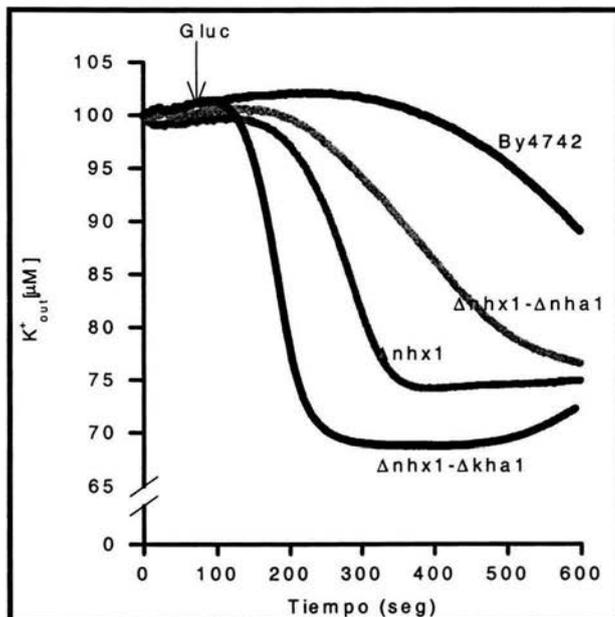
El transporte de potasio se determinó mediante el uso de un electrodo específico para este catión. Las condiciones del medio en las que se registró esta actividad fueron pH 6.0 y MES-TEA 10 mM. Los trazos se observan en las Figuras 6 y 6 a continuación.



**Figura 5. Transporte de potasio de las cepas Fy833 y las mutantes.** Las células se crecieron en YPD 18 hr y se ayunaron 15 hr. Después de colocar el medio de cada experimento (MES-TEA 10 mM, pH 6.0) en la celda, para un volumen final de 10 ml y 100  $\mu M$  de KCl, se inició el trazo agregando 125 mg de células. Se agregó 50 mM de glucosa para energizar las células y el transporte. El potasio del medio se detectó mediante un electrodo específico.

La línea base inicial corresponde a la concentración de potasio existente en el medio (100  $\mu M$ ). Al agregar las células a los 10 segundos, se observó un aumento muy pequeño en la concentración de  $K^+$ , debido a la salida de este catión. El trazo se puede seguir durante

dos minutos sin observar ningún cambio importante, pero al agregar glucosa al medio se observó una disminución del potasio extracelular, lo que implica la entrada del catión a la célula. Los trazos de transporte de  $K^+$  observados para las cepas silvestres FY833 y BY4742 se utilizaron para comparar con sus respectivas mutantes (Figs. 5 y 6).



**Figura 6. Transporte de potasio de las cepas BY4742 y sus mutantes.** Las células se crecieron en medio YPD 18 hr y se ayunaron 15 hr. Después de colocar el medio de cada experimento (MES-TEA 10 mM, pH 6.0) en la celda, para un volumen final de 10 ml y 100  $\mu$ M de KCl, se inició el trazo agregando 125 mg de células. Luego se agregó glucosa 50 mM, para energizar las células. El potasio del medio se detectó mediante un electrodo específico para este catión.

Las diferencias importantes registradas en las mutantes pero analizadas de manera independiente por cada fondo genético, son las siguientes:

Mutaciones construidas para la cepa FY833:

- La eliminación de Kha1p o Nah1p (de manera simple o combinada), no afectó el transporte ni la acumulación del  $K^+$ , en comparación de su cepa silvestre.

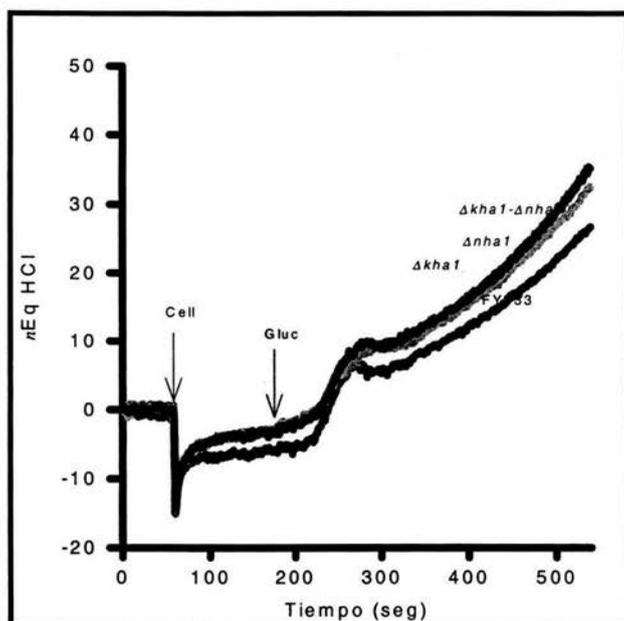
Mutaciones construidas para la cepa BY4742:

- La ausencia de Nhx1p, aumentó la velocidad de entrada del  $K^+$ , pero no la acumulación.
- La ausencia simultánea de Nhx1p y Kha1p aumentó la acumulación de  $K^+$  y la velocidad de su transporte.
- Sin embargo, la doble eliminación de Nhx1p y Nah1p, resultó en una disminución de la acumulación del  $K^+$  y la velocidad de su transporte, en comparación con la mutante simple de Nhx1p.

### **El bombeo de protones.**

La formación del potencial electroquímico necesario para el transporte del  $K^+$  se debe al bombeo de  $H^+$  por la ATPasa de la membrana plasmática; era entonces obligado medir este parámetro, siguiendo los cambios del pH del medio con un electrodo para tal efecto, en un medio a pH 6.0 (Figs. 7 y 8). Al agregar las células de las cepas silvestres (FY833 o BY4742), se registró una pequeña alcalinización del medio, y al agregar glucosa (después de 2 min), una acidificación (trazo hacia arriba) que continuó por lo menos 5 minutos más. Estos trazos se utilizaron para comparar todas las cepas mutantes. Bajo estas condiciones se observó lo siguiente:

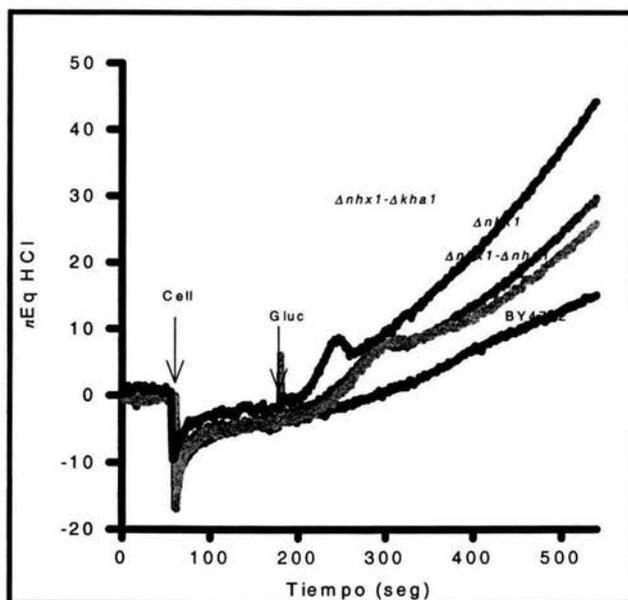
- En comparación con el bombeo normalmente observado con la cepa silvestre FY833, se observó una actividad ligeramente similar en las mutantes que presentan la eliminación sencilla o combinada los genes *KHAI* y *NHAI* (Fig. 7).
- En las cepas derivadas del la BY4742, la ausencia de *Nhx1p*, así como la de los dos intercambiadores, *Nhx1p* y *Nah1p*, estimuló ligeramente la actividad de bombeo de protones de las mutantes, en comparación de la cepa silvestre (Fig. 8).



**Figura 7. Bombeo de protones al medio por las cepas Fy833 y sus mutantes.** 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 y se agregaron 125 mg de células. Posteriormente se agregó 50 mM de glucosa, para energizarlas. Los protones se detectaron mediante un electrodo de pH.

- La eliminación sencilla del gene *NHX1* estimuló aún más la acidificación del medio, en comparación de la cepa silvestre. Pero si a esta mutante simple se elimina *KHAI* de

manera simultánea, la acidificación del medio extracelular se incrementa ahora mucho más que el registrado para la cepa simple *Δnhx1* (Fig. 8).



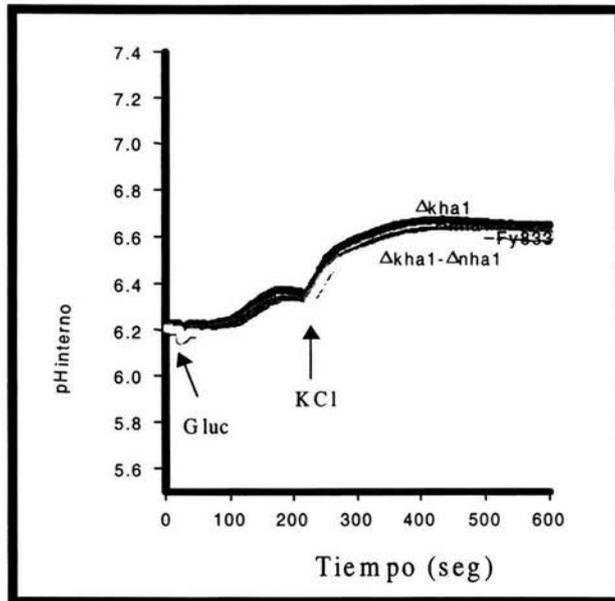
**Figura 8. Bombeo de protones al medio por las cepas BY4742 y sus mutantes.** Después de colocar el medio (MES-TEA 2 mM, pH 6.0) en la cámara, para un volumen final de 10 ml, se inició el trazo de lectura y se agregaron 125 mg de células. A los 2 min, se agregó 50 mM de glucosa, para energizar las células. Los protones presentes en la cámara se detectaron mediante un electrodo de pH.

- Es necesario señalar que a diferencia del bombeo de protones registrado para la cepa silvestre FY833, la cepa BY4742 presenta poca actividad después de agregar la glucosa, o inclusive el  $K^+$  (Figs. 7 y 8).

#### Los cambios del pH intracelular.

Si los protones bombeados al exterior provienen del interior de la célula, es necesario medir los cambios del pH intracelular mediante la piranina introducida a las células por

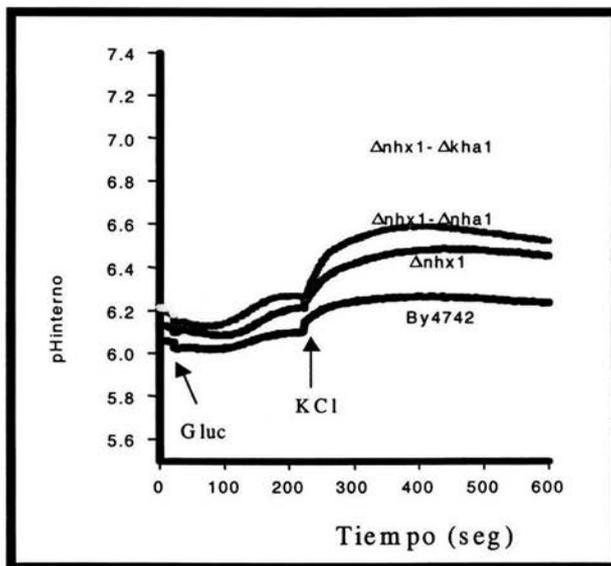
medio de electroporación (Material y Métodos). Las células cargadas con piranina se colocaron en MES-TEA 10 mM, pH 6.0; y se siguió en el tiempo la fluorescencia de 460→520 nm, para medir los valores del pH. Se obtuvieron los trazos antes de agregar glucosa, del efecto de este sustrato y luego de la adición de KCl.



**Figura 9. Cambios del pH intracelular, de las cepas Fy833 y sus mutantes. Efectos de la glucosa y del K<sup>+</sup>.** Las células se crecieron en YPD 18 hr y se ayunaron 15 hr. Se colocaron 25 mg de las células electroporadas con piranina en una celda con MES-TEA pH 6.0, 10 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, y posteriormente KCl 50 mM.

Los trazos de las Figuras 9 y 10, 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 otro mayor al agregar el K<sup>+</sup>.

En los trazos de las cepas silvestres, inmediatamente después de agregar la glucosa, se observó, como en otras cepas (Peña, *et al.*, 1998), una acidificación pequeña y pasajera del interior celular, seguida de un aumento lento del pH. Al agregarles el K<sup>+</sup> se observó un aumento más rápido del pH, que se estabilizó entre 6.6 y 6.2 (FY833 y BY4742 respectivamente). Los datos más relevantes de estos experimentos son los siguientes:



**Figura 10. Cambios del pH intracelular, de las cepas BY4742 y sus mutantes. Efecto del K<sup>+</sup>.** Se colocaron 25 mg de las células electroporadas con piranina en una celda con MES-TEA pH 6.0, 10 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, y posteriormente KCl 50 mM.

- En la cepa FY833, la eliminación de los genes *KHA1* y *NHA1* simple o doble, no modificó los cambios del pH intracelular (Fig. 9).
- La cepa BY4742 mostró cambios menores en su pH interno que la FY833, y la ausencia de *Nhx1p* resultó en un aumento mayor del pH intracelular, que el de la cepa silvestre. Este fenotipo se observó al eliminar simultáneamente a *Nha1p* (Fig. 10).

- También en la cepa *Δnhx1*, la eliminación adicional de *Nha1p* y *Kha1p* resultó en valores más alcalinos que los observados para la mutante simple de ambos genes, pero más aún en la segunda (Figs. 9 y 10).

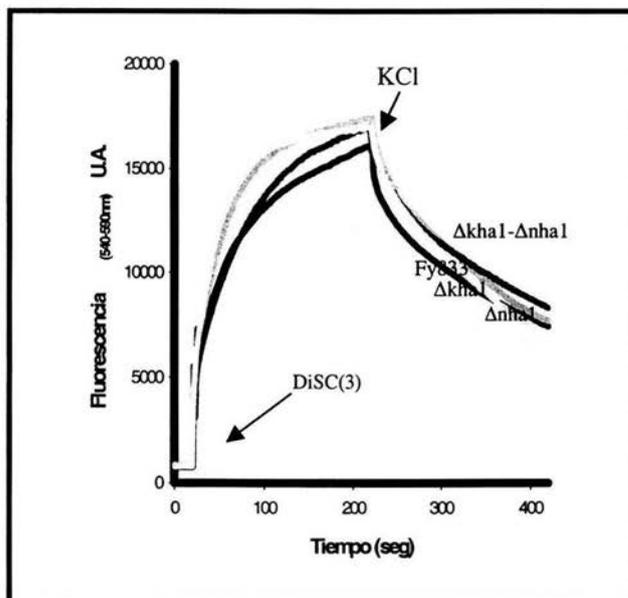
Es necesario señalar también que con la cepa FY833, de manera semejante a lo reportado por Calahorra y cols. (1998), si las células electroporadas con piranina se incuban con glucosa, el indicador fluorescente se acumula lentamente en la vacuola; no así en la cepa BY4742, en la que la piranina no se acumuló en la vacuola, no obstante incubarla en presencia de glucosa o de glucosa mas  $K^+$ . Esto se verificó observando las células al microscopio, de modo que en esta última cepa, se tiene la seguridad de que el pH que se mide corresponde exclusivamente al citoplasma.

#### **Estimación del potencial de membrana.**

Otro de los parámetros medibles, esencial en el transporte del  $K^+$ , es el potencial de la membrana plasmática. En la Figura 10, se muestran los experimentos en que se estimó el potencial de membrana, empleando a la 3,3'-dipropiltiacarbocianina, o DiSC<sub>3</sub>(3), que se distribuye siguiendo la formación del potencial de membrana, y en las condiciones que se utiliza aumenta su intensidad de fluorescencia a 540 → 590 nm al aumentar el  $\Delta\Psi$  de la membrana plasmática (Peña, *et al.*, 1984).

Después de agregar las células, se dejaron incubar por dos minutos antes de llevarlas al fluorómetro. Luego, al cabo de 200 segundos, se inició el trazo agregando 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 luego al agregar KCl (Peña, *et al.*, 1984). Este abatimiento del potencial

de membrana de las células de las cepas silvestres, llevó los niveles de fluorescencia a alrededor de la mitad del valor máximo inicial (Figs. 11 y 12). Los resultados de todas las cepas mutantes se muestran en ambas gráficas.

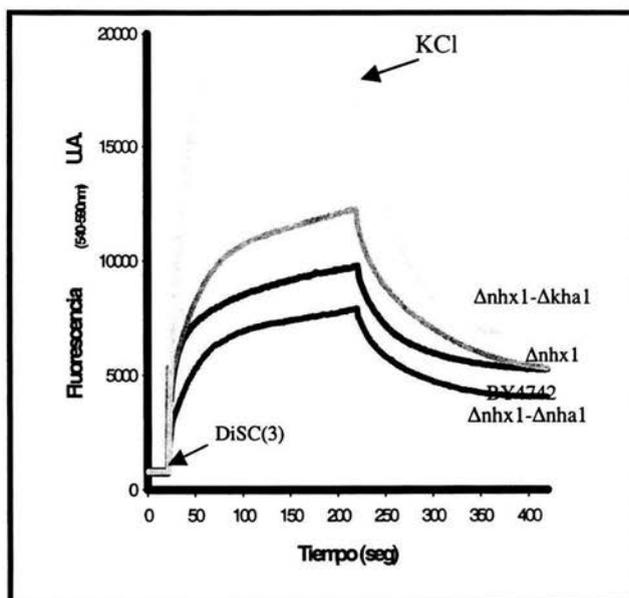


**Figura 11. Estimación del potencial de membrana de la cepa Fy833 y sus mutantes; efecto de la adición de  $K^+$ .** Las células (25 mg) se agregaron al siguiente medio: CCCP 10  $\mu$ M,  $CaCl_2$  100  $\mu$ M, glucosa 50 mM y MES-TEA pH 6.0, 2 mM, para un volumen final de 2ml, y se incubaron durante dos minutos. Luego se agregó la cianina 0.25  $\mu$ M. Después se agregó KCl (50mM) para observar el abatimiento del potencial. La fluorescencia se siguió a 540 $\rightarrow$ 590 nm. U.A: Unidades Arbitrarias.

Los resultados obtenidos se pueden resumir de la siguiente manera:

- En la cepa FY833, las mutantes en que se eliminó el antiportador Kha1p solo, o en combinación de Nah1p, mostraron un incremento ligero en la velocidad de formación del potencial de membrana en comparación con la cepa silvestre; en correspondencia con el

comportamiento observado en el bombeo de  $H^+$ . Mientras que el abatimiento del potencial al momento de agregar  $K^+$  parece ser similar para todas estas cepas (Fig. 11).



**Figura 12.** Estimación del potencial de membrana de la cepa BY4742 y sus mutantes; efecto de la adición de  $K^+$ . Las células (25 mg) se agregaron al siguiente medio: CCCP 10  $\mu$ M,  $CaCl_2$  100  $\mu$ M, glucosa 50 mM y MES-TEA pH 6.0, 2 mM, para un volumen final de 2ml, y se incubaron durante dos minutos. Luego se agregó la cianina 0.25  $\mu$ M. Después se agregó KCl (50mM) para observar el abatimiento del potencial. La fluorescencia se siguió a 540 $\rightarrow$ 590 nm. U.A: Unidades Arbitrarias.

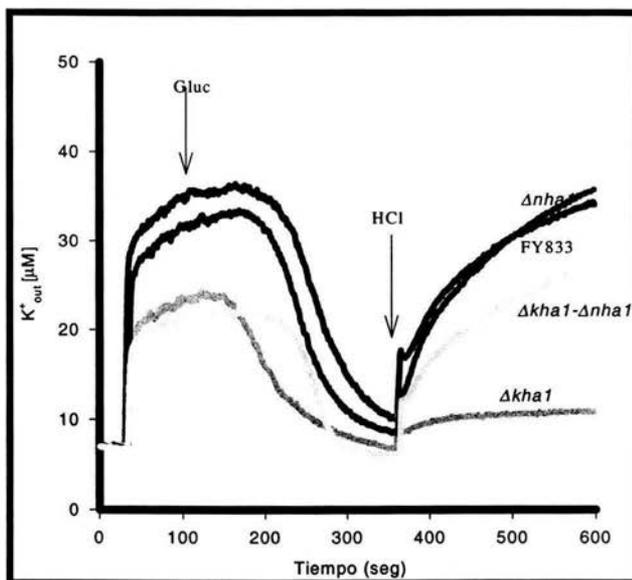
- En la cepa BY4742 y sus mutantes se observó un mayor potencial de membrana en las cepas sin Nhx1p, pero menor que en la silvestre con la eliminación combinada de Nha1p, en la que el potencial fue menor que el de la cepa silvestre (Fig. 12).
- En el fondo genético  $\Delta nhx1$ , la ausencia simultánea de Kha1p llevó hasta cerca del doble la señal del potencial de membrana registrado para la cepa silvestre (Fig. 12).

### **Efectos de la acidificación del medio sobre los movimientos del $K^+$ .**

Dado que los productos de los tres genes estudiados son antiportadores  $K^+/H^+$ , se decidió observar el efecto de la acidificación del medio, agregando ácido clorhídrico en el punto en que los trazos del  $K^+$  en el medio alcanzaban su nivel mínimo, en condiciones semejantes a las de las Figs. 6 y 7, pero sin agregar  $K^+$ . Se registró la línea base, que corresponde a la concentración de potasio existente en el medio (cerca de  $7 \mu M$ ). Al minuto se agregaron las células, observando un aumento en la concentración de  $K^+$ , salido de las células. Este trazo se puede seguir durante unos minutos, registrándose una salida lenta pero constante del  $K^+$ . Se agregó luego glucosa al medio, energizando las células, y se observó una disminución del potasio extracelular, que implica la entrada del catión a la célula. Cuatro minutos después, se agregó  $50 \mu M$  de HCl bajo la lógica de que las células puedan intercambiar  $H^+$  por  $K^+$  interno (Figs. 13 y 14).

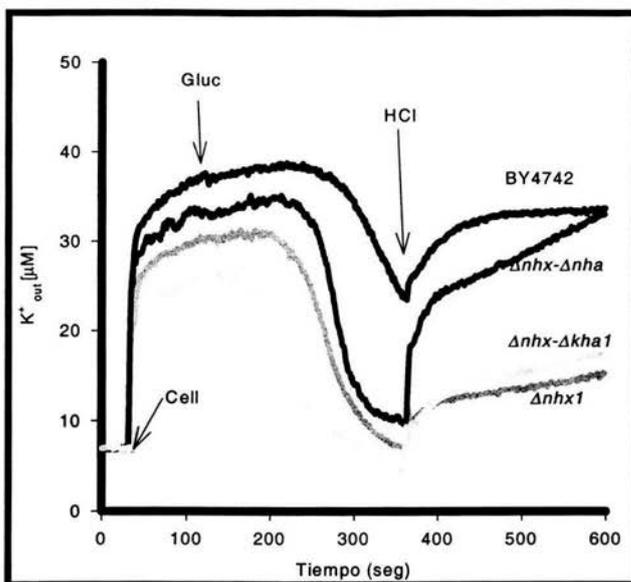
Los principales resultados encontrados fueron los siguientes:

- En la cepas silvestres (FY833 y BY4742),  $\Delta nha1$ ,  $\Delta kha1-\Delta nha1$  y  $\Delta nhx1-\Delta nha1$ , la adición de  $H^+$  al medio extracelular produjo una salida de  $K^+$  similar en cantidad a la ya registrada al inicio del trazo por la adición de las células (Figuras 13 y 14).
- En ausencia de  $Kha1p$ , se observó una menor salida del  $K^+$  al agregar HCl. Pero curiosamente, tal comportamiento desapareció en la cepa en la que también se eliminó  $NHA1$  (Figura 13).



**Figura 13. Salida de  $K^+$  producida por la acidificación externa en la cepa FY833 y sus mutantes.** Las células se crecieron en medio YPD con uracilo y adenina durante 18 hr y se ayunaron 15 hr. Después de colocar el medio (MES-TEA 10 mM, pH 6.0) en la celda, para un volumen final de 10 ml, se inició el trazo agregando 125 mg de células. Posteriormente se agregó glucosa 50 mM para energizar las células; a los cuatro minutos se agregó HCl 50  $\mu$ M (trazo representativo).

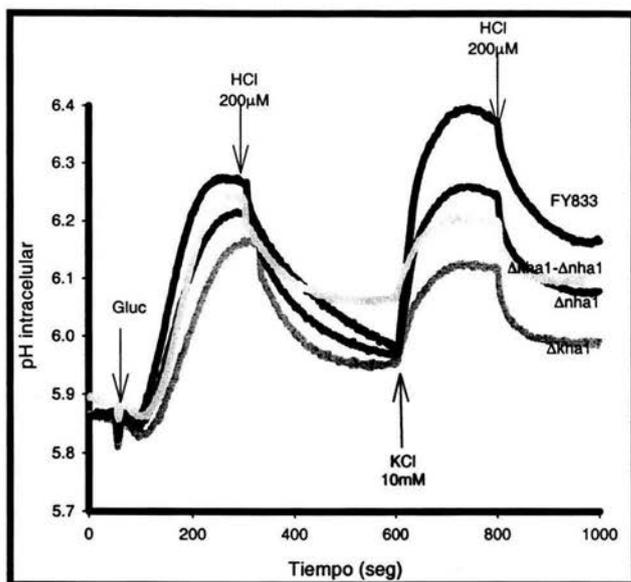
- En la BY4642 sin Nhx1p también se observó la disminución notable de la salida de  $K^+$  ante la adición de HCl, en comparación con su cepa silvestre. Sin embargo, la eliminación combinada de *NHX1* y *NAH1* mostró un comportamiento semejante al de la cepa silvestre (Figura 14).
- La ausencia de Nha1p no afectó ostensiblemente el comportamiento de las cepas en que se eliminó sola o combinada con Kha1p (Figura 13) o Nhx1p (Figura 14).



**Figura 14. Salida de  $K^+$  producida por el HCl en las cepas BY4742 y sus mutantes.** Las células se crecieron en medio YPD con uracilo y adenina durante 18 hr y se ayunaron 15 hr. Después de colocar el medio (MES-TEA 10 mM, pH 6.0) en la celda, para un volumen final de 10 ml, se inició el trazo agregando 125 mg de células. A los 2 min se agregó glucosa 50 mM para energizar las células; y cuatro minutos después se agregó HCl 50  $\mu$ M.

### **Efectos de la acidificación del medio sobre el pH interno.**

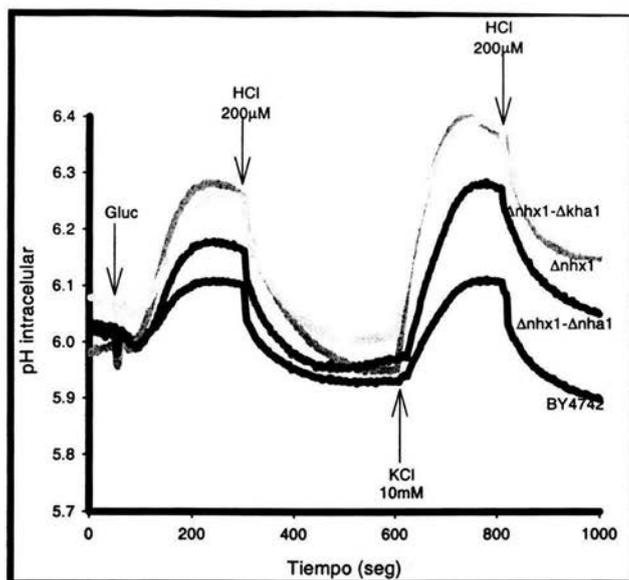
Dado que en algunas de las mutantes la acidificación del medio produjo una salida del  $K^+$ , por un probable intercambio por  $H^+$ , se decidió observar la acidificación producida por la adición de HCl 200  $\mu$ M, y una vez lograda ésta, agregar 50 mM de KCl, en un intento de detectar la actividad de los antiportadores. De ser esto cierto, la adición de ácido debería producir un menor cambio del pH interno, principalmente en la mutante de Kha1p, pero además, la subsecuente adición de KCl tampoco debería producir, o producir un aumento menor del pH interno.



**Figura 15. Cambios del pH intracelular de las cepas FY833 y sus mutantes ante la acidificación del medio.** Se colocaron 25 mg de las células electroporadas con piranina en una celda con MES-TEA pH 6.0, 10 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, luego 250 μM de HCl y al final se agregó KCl 50 mM (trazo representativo).

Para los trazos de cada mutante, se consideró como control experimental el obtenido con su respectiva cepa silvestre. Los resultados relevantes son los siguientes:

- En primer lugar, al comparar las cepas silvestres con sus respectivas mutantes, en contra de lo esperado a partir de los experimentos en que la adición de HCl produjo una salida diferente de  $K^+$  en algunas de ellas, en los experimentos de medición de pH interno no se observaron diferencias ante la adición del HCl (suponiendo que la salida del  $K^+$  observada antes hubiera sido por un intercambio de  $H^+$ ).



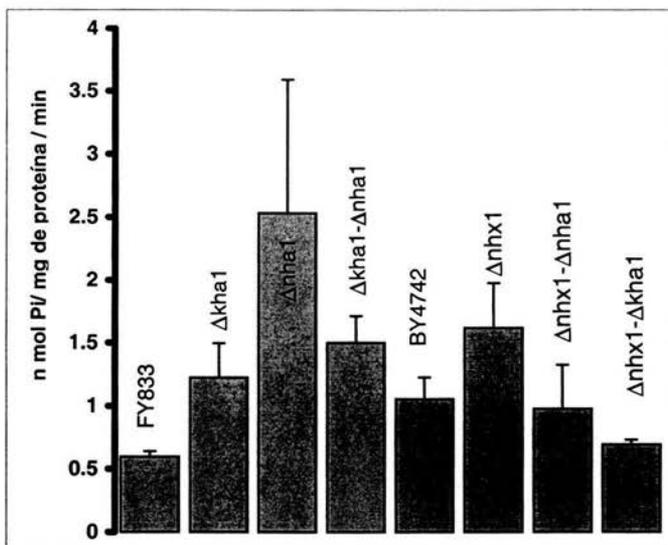
**Figura 16. Cambios del pH intracelular de las cepas BY4742 y sus mutantes ante la acidificación del medio.** Se colocaron 25 mg de las células electroporadas con piranina en una celda con MES-TEA pH 6.0, 10 mM, para un volumen final de 2 ml. El trazo se inició agregando las células ante agitación constante. Pasados 60 seg se agregó glucosa 50 mM, luego 250  $\mu M$  de HCl y al final se agregó KCl 50 mM (trazo representativo).

- En la cepa FY833 y sus mutantes, si bien no se observó diferencia en la acidificación producida por el HCl en ninguna de ellas, luego de la adición posterior del  $K^+$ , sí se encontró que todas las mutantes mostraron una menor alcalinización al agregar  $K^+$ .
- En la cepa BY4742 y sus mutantes, nuevamente, no se observó diferencia en la acidificación producida por el HCl. Llama además la atención que luego de la adición del  $K^+$ , la cepa silvestre (BY4742) no mostrara ninguna alcalinización, y que ésta fuera mayor en la cepa sin la  $Nhx1p$ . Por otra parte, ante la eliminación adicional de  $Nah1p$  y  $Kha1p$ , pero más del segundo intercambiador, el aumento del pH fue menor que en la cepa sin  $Nhx1$  (Fig. 16)
- La actividad de los organelos puede verse dañada por la presencia de  $H^+$  en exceso irrumpiendo abruptamente en el interior celular, afectando posiblemente la actividad de

la mitocondria, dicho fenómeno puede explicar la ausencia de respuesta por parte de las cepas, silvestre BY4742,  $\Delta nha1$  y  $\Delta nhx1-\Delta kha1$ ; Este dato parece concordar con una actividad respiratoria menor presente tanto para la cepa BY4742 como  $\Delta nha1$  (Fig. 16).

#### **Actividad de hidrólisis de ATP en membrana plasmática.**

La actividad de la  $H^+$ -ATPasa de la membrana plasmática es fundamental para la célula, ya que gracias a su bombeo de  $H^+$  se genera el gradiente electroquímico que se emplea para llevar a cabo el transporte de sustratos al interior celular. Se decidió medir dicha actividad debido a que una gran cantidad de nuestros fenotipos observados (incremento de la velocidad del transporte de  $K^+$  al interior celular, alcalinización del pH intracelular y el potencial de membrana) se pueden explicar por la simple actividad modificada de Pma1p ( $H^+$ -ATPasa de membrana plasmática) bajo estas condiciones de estudio. Los experimentos se realizaron purificando membrana plasmática de cada una de la cepas de estudio, como se describió en Materiales y Métodos. Debe mencionarse que antes de iniciar la purificación de membrana, las células fueron incubadas en glucosa para poder así activar a Pma1p (Serrano *et al*, 1983).



**Figura 17. Actividad de hidrólisis de ATP en membrana plasmática de las cepas FY833, BY4742 y las mutantes.** De cada cepa, se purificó la membrana plasmática, que se incubó en PIPES-KOH 50 mM, pH 7.0, ATP 5 mM, MgCl<sub>2</sub> 5 mM, Azida de sodio 5 mM, PEP 5 mM. El fosfato inorgánico liberado se midió por el método de Sumner.

El resumen de los resultados de los experimentos de la figura 16 es el siguiente:

- En todas las mutantes construidas en el fondo genético FY833, se observó un aumento de la actividad de hidrólisis de ATP en relación con su cepa silvestre. Sin embargo, el mayor aumento se observó para la mutante de Nha1p, seguida de la doble mutante, y luego la mutante de Kha1p.
- En las mutantes de la cepa BY4742, la eliminación de Nhx1p aumentó la actividad de la ATPasa. Mientras que a  $\Delta nhx1$  se le eliminó simultáneamente los genes *NHA1* o *KHA1*, se observó una disminución de la actividad de la enzima, llegando hasta cerca de la mitad en la doble mutante  $\Delta nhx1-\Delta kha1$  en relación con la cepa silvestre.

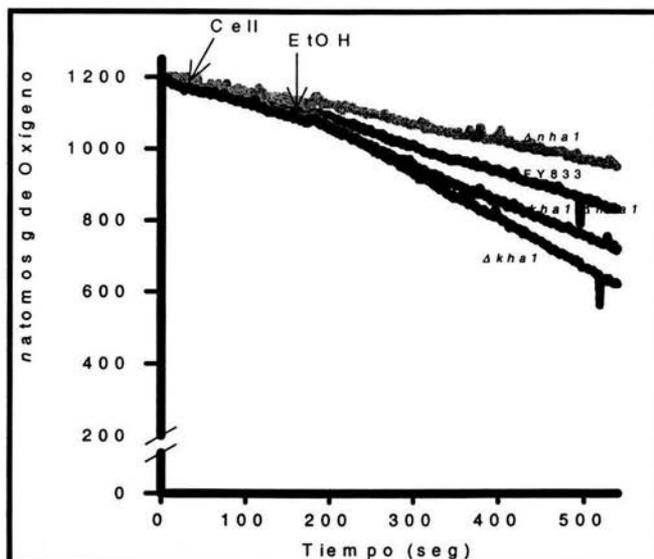
### Actividad respiratoria.

De acuerdo con estudios *in silico* de predicción estructural en busca de una secuencia importadora mitocondrial, así como los análisis de secuencias homólogas con genes de *Rickettsia sp.*, y el estudio del crecimiento en medios con sustratos no fermentables, se ha propuesto que Nha1p, Kha1p y Nhx1p son proteínas involucradas en la homeostasis mitocondrial (Steinmetz et al. 2000). Si la ausencia de este tipo de proteínas puede afectar la homeostasis de la mitocondria, es de esperar que también afecte la actividad respiratoria de cada una de las mutantes. Con base a estos antecedentes se midió la respiración de las células enteras a las que se adicionó etanol como sustrato mitocondrial, mismo que se degrada a acetaldehído, donando dos electrones a la cadena transportadora de electrones presente en la membrana interna mitocondrial, por intermedio del NADH (Kwast, *et al.* 2002), (Figs. 18 y 19).

El resumen de los resultados del consumo de oxígeno es el siguiente:

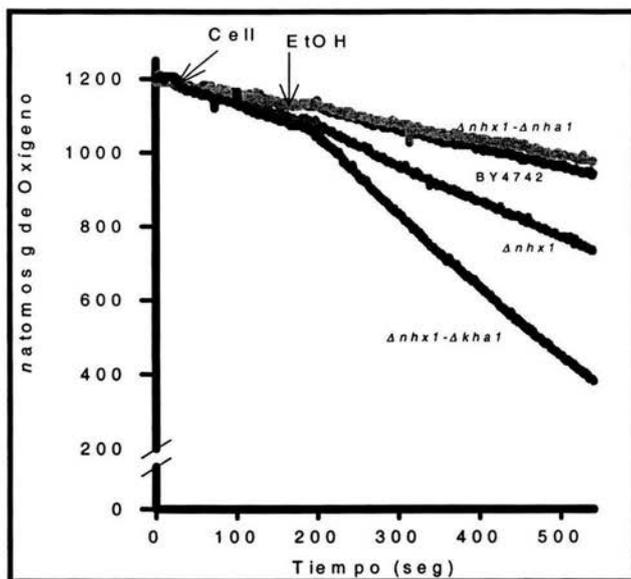
- En las dos cepas en que se eliminaron Kha1p sólo o en combinación de Nah1p, la velocidad de consumo de O<sub>2</sub> fue mayor que para FY833 (Fig. 18).
- La eliminación de *NHA1* redujo la velocidad respiratoria, en comparación con las cepas silvestres.
- La eliminación simultánea de Nha1p y Kha1p, de cualquier forma aumentó el consumo de O<sub>2</sub>, ya observada en  $\Delta kha1$ , pero menos que en esta mutante (Fig 19).

- En la cepa sin *NHX1*, se observó un aumento importante de la velocidad de consumo de oxígeno (Fig. 19).



**Figura 18. Respiración de las células de FY833 y sus mutantes.** Las células se crecieron en medio YPD 18 hr y se ayunaron 15 hr. Al medio de cada experimento (MES-TEA 2 mM, pH 6.0) en la cámara, para un volumen final de 3 ml, se agregaron 40 mg de células/ml, seguidas de 33 mM de etanol (trazos representativos).

- Al eliminar de manera simultánea *Nhx1p* y *Kha1p*, se observó un aumento en la velocidad de consumo de  $O_2$ , que fue mucho mayor que el registrado de manera independiente para cada gene eliminado solo (Fig. 19).
- En comparación con la cepa FY833 en donde se observó un aumento de la respiración con etanol, la cepa BY4742 casi no aumentó su respiración (Figs. 18 y 19).



**Figura 19. Respiración de las células de BY4742 y sus mutantes.** Las células se crecieron en medio YPD 18 hr y se ayunaron 15 hr. Al medio de cada experimento (MES-TEA 2 mM, pH 6.0) en la cámara, para un volumen final de 3 ml, se agregaron 40 mg de células/ml, seguidas de 33 mM de etanol (trazos representativos).

## DISCUSIÓN.

En *S. cerevisiae* el potasio entra a la célula a través de los sistemas de transporte de baja y de alta afinidad (Rodríguez-Navarro y Ramos, 1984), ambos clonados ya (Gaber *et al.*, 1988, Ko *et al.*, 1990). Una vez dentro, el catión parece distribuirse hacia toda la célula, pero en buena parte a la vacuola (Blumwald, 2000). En este trabajo, a pesar de que las distintas cepas sufrieron la ablación de uno o varios de los principales genes implicados en el sistema de antiportador catión /  $K^+$ , la acumulación del potasio en las células es esencialmente el mismo, a excepción de la mutante:  $\Delta nhx1-\Delta kha1$ , donde fue evidente un aumento de la acumulación de este catión.

### **Efectos de la eliminación de los genes sobre la homeostasis del $K^+$ y del pH interno.**

#### **El papel de Kha1p:**

Los resultados de la eliminación del gene *KHA1* en la cepa FY833 son diferentes a los descritos por Ramírez, *et al.* (1998). Los efectos encontrados antes, utilizando la cepa silvestre W303 1A, parecen haberse debido a que las células *ura3<sup>-</sup>*, se crecieron en ausencia de uracilo, y la interrupción del gene se hizo utilizando un cassette que contenía el gene *URA3*, que confería a las células una mayor capacidad para crecer, bombear protones, transportar potasio y producir mayores cambios en el pH interno. Un resultado similar fue descrito por Chopra *et al.*, (1999), quienes eliminaron al gene *ATH1* (que codifica para una trehalasa vacuolar ácida), empleando el cassette de *URA3*. En su trabajo muestran que este cassette solo, introducido al genoma de la levadura causaba un fenotipo similar al descrito antes para la mutante  $\Delta ath1::URA3$ . Es por ello que la presencia de este cassette de *URA3*

puede causar artefactos en los fenotipos registrados para las mutaciones realizadas en *S. cerevisiae*. Por eso, decidimos cambiar de marcador de auxotrofia, y empleamos el cassette de *HIS5<sup>+</sup>* (gene de *Shizosaccharomyces pombe*) y el de *TRP1* (gene de *S. cerevisiae*), siendo el primero ortólogo a *S. cerevisiae*, mientras que el segundo es parólogo (Longtine *et al*, 1998), complementa una vía ausente de nuestras cepas pedigree (FY833). Esta ventaja se aprovechó, haciendo mutaciones del mismo gene, pero bajo diferente marcador de auxotrofia, esto nos daría cierta tranquilidad frente al fenotipo observado, ahora sólo dependiente de la mutación del gene de estudio.

Hubo dos tipos de resultados en cuanto a la homeostasis del  $K^+$  y los cambios del pH interno. En las mutantes de la cepa FY833, prácticamente no se observaron diferencias entre la cepa silvestre y las mutantes sencillas de *NHA1*, *KHA1* ni  $\Delta nha1$ - $\Delta kha1$  en la acumulación o transporte de  $K^+$ , ni en los cambios del pH interno. Sí se encontró un bombeo de protones ligeramente mayor, y una instalación ligeramente más rápida del potencial transmembranal de la membrana plasmática de las mutantes  $\Delta kha1$ . En la cepa BY4742, por otra parte, todas las mutaciones producidas mejoraron el desempeño de las células en todos esos parámetros. Mas aún, la ausencia de *Nhx1p* y *Kha1p* resultó en un aumento sustancial de la acumulación de  $K^+$  por las células.

*KHA1* no es esencial, y su eliminación en la cepa FY833 no produjo cambios importantes en el funcionamiento de las células, a excepción del incremento de la actividad respiratoria. 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 experimentos preliminares y no mostrados para este trabajo, se fusionó a este antiportador por su extremo carboxilo terminal a la proteína verde fluorescente (GFP), y se encontró que esta proteína antiportadora  $H^+/K^+$  no

está localizada en membrana plasmática de las células, sino distribuida en el interior de la célula, aún no fue posible definir su localización precisa, ni tampoco eliminar la posibilidad de que al marcarla con la proteína verde se presenten problemas por su procesamiento, ya que algunos autores (Zeng *et al*, 2004) han observado que una parte de la proteína marcada no llega a su destino final, siendo la culpable la GFP fusionada a la proteína de estudio. Esto es debido a que posiblemente se afecta el arreglo conformacional más estable de la proteína membranal antiportadora  $H^+/K^+$ , siendo afectadas principalmente las regiones de señalización para la direccionalidad dentro de la célula, estas regiones quedarían ocultas por este nuevo re-arreglo conformacional proteico; una manera de solucionar este problema, es adicionar pequeños epítopes de HA (hemaglutinina) (Longtine *et al*, 1998), mismos que por ser tan pequeños no afectan mayormente la conformación espacial de la proteína de estudio (Ferreira *et al*, 2002); aún estamos trabajando en este problema. Por otro lado, la adición de HCl al medio extracelular mostró que en ausencia de este antiportador no se observó respuesta de salida de  $K^+$ , indicando que pudiera estar en la membrana plasmática, nuestros experimentos con GFP fusionada indiquen lo contrario. Si fuera cierta esta observación, cada  $H^+$  introducido a la célula tendría que sacar un  $K^+$  debido a la existencia de un antiportador catión /  $H^+$  en la membrana plasmática, pero queda la duda frente a ambos experimentos que se contraponen. Recientemente, el grupo de trabajo de la Dra. Sychrova ha fusionado también a la proteína de *KHAI* con GFP, y sus resultados muestran que este antiportador se localiza en membranas de algún organelo de la levadura, el cuál, no se ha determinado.

### **El papel de Nha1p:**

De acuerdo con nuestros experimentos y los de otros investigadores (Prior *et al*, 1996), Nha1p tampoco es un antiportador esencial, debido a que bajo diferentes combinaciones y condiciones de estudio, la célula parece no depender directamente de este gene para poder vivir. El grupo de trabajo de Prior, para poder observar un fenotipo claro dependiente de la ausencia del gene *NHA1*, lo eliminan en una mutante carente de los *ENAs*, aunque Sychrova lo elimina con el cassette de *URA3*. Bajo estas combinaciones de genes ausentes, la eliminación de este antiportador  $H^+/K^+$ , realmente afecta la fisiología del transporte de  $Na^+$  y  $K^+$ , en nuestras combinaciones este gene no afecta la viabilidad celular.

También en el estudio de las mutantes de este transportador se observaron diferencias entre las dos cepas silvestres estudiadas. En las mutantes de la cepa FY833, su eliminación aislada no tuvo efecto alguno en 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. En las mutantes de la cepa BY4742, por otra parte, su eliminación mejoró esos mismos parámetros, excepto el potencial eléctrico de la membrana plasmática de las mutantes dobles  $\Delta nhx1-\Delta nha1$ , en las que se encontró disminuido; esto puede tener relación con que esta mutante es la que mostró menor actividad respiratoria.

La mutante  $\Delta nha1$  es la única que presenta una actividad de hidrólisis de ATP de membrana plasmática mucho mayor que la registrada para las otras mutantes; esto no correlaciona con ningún cambio del potencial eléctrico de la membrana plasmática, registrado de manera indirecta con CCCP y cianina ( $DiSC_3(3)$ ), ni mucho menos con la medición de acidificación del medio extracelular. Esto se puede explicar simplemente al error experimental.

El intercambio de  $H^+$  por  $K^+$  llevado a cabo en nuestras condiciones de estudio (después de agregar HCl al exterior celular), la mutante simple de *NHAI* muestra un fenotipo similar a su silvestre, lo cual indicaría que *kha1p* sea el responsable directo de este intercambio de protones por potasio, el experimento inverso sea diferente. Es decir, cuando se obliga al sistema a acidificar su pH intracelular y luego estos  $H^+$  sean recambiados por  $K^+$  después de ser agregado el KCl al medio extracelular, la mutante  $\Delta nhai$  presenta una respuesta menor en su alcalinización del pH interno en comparación a su cepa silvestre. En ambos experimentos *NHAI* parece participar de manera indirecta o secundaria en estos intercambios de  $H^+ / K^+$ . Esto contrasta con lo propuesto por Bañuelos *et al.*, (2002); este grupo propone a *NHAI* como el antiportador encargado por excelencia de la salida de  $K^+$  de la célula, pero el problema de este trabajo es: para ver el fenotipo  $\Delta nhai$  debe combinarlo con la ausencia simultánea de los genes *ENAs*. Como lo demuestran nuestros resultados, la acumulación de  $K^+$  intracelular total no se vio modificada sólo por la ausencia simple de este antiportador, sino de la mutación simultánea de los genes *KHAI* y *NHX1*, siendo *Nhx1p* el único antiportador responsable de la salida de  $K^+$ , pero la entrada de este catión a la célula es tan alta (a través de los Trks), que es difícil pensar que esa salda sea equivalente. Aún así, bajo estas condiciones de estudio, *NHAI* sigue siendo de poca importancia.

### **El papel de *Nhx1p*:**

*Nhx1p* tampoco es esencial; los resultados, en el sentido de un pequeño aumento de la acumulación de potasio ante su mutación simple, pueden deberse a que la eliminación de este antiportador  $H^+ / K^+$  disminuyó la salida del potasio de la célula, según las medidas de la acumulación de  $K^+$  (~160mM), del registro con electrodo de  $K^+$  (aceleración del

transporte de potasio), de la ausencia de respuesta de salida de  $K^+$  frente a la adición de  $H^+$  al medio (medido tanto con un electrodo para pH, como con piranina introducida a la célula). En cuanto a los cambios del pH intracelular, el aumento del bombeo de  $H^+$  y del potencial de membrana pueden deberse a que en general, la cepa BY4742 se comporta como una célula con bajas capacidades en todos estos parámetros. Por otra parte, la eliminación doble de *Nhx1p* y *Kha1p* produjo un aumento generalizado en todos los parámetros estudiados en relación con la homeostasis del  $K^+$  y del pH interno. Esto no se explica por el mero incremento de la actividad desregulada de *PMA1*, ya que por otro lado la mutante  $\Delta nhx1$ , presenta una actividad de hidrólisis de ATP ligeramente mayor que su cepa silvestre, la actividad registrada para la mutante  $\Delta nhx1-\Delta kha1$ , presenta una disminución en la hidrólisis, lo cuál no correspondería con un incremento del transporte de  $K^+$ , mismo que es acelerado para esta mutante, siendo por tanto ambos parámetros independientes y el transporte de potasio no dependería directamente de un incremento de la actividad de *PMA1*, sino del potencial de membrana establecido, siendo esta diferencia la que aumente su acumulación. Esta mutante doble presenta un estimado de  $\Delta\Psi$  mayor que el registrado para las demás mutantes de BY4742, sea una consecuencia conjunta de la ausencia de un antiportador de vacuola y posiblemente de otro organelo. Pero también dicha diferencia, se podría explicar, no con un incremento de la actividad específica de *PMA1*, sino por el hecho de que esta actividad esté sobrada en la membrana, de modo que un aumento de su actividad no necesariamente implica un aumento de la acumulación del  $K^+$ .

Este transportador se ha descrito en plantas como un antiportador presente en la membrana vacuolar (Nass *et al*, 1997, Orlowski *et al*, 1997); en la levadura se le ha

localizado en las vesículas prevacuolares (Nass y Rao, 1998). Su eliminación del genoma silvestre afectó la fisiología de la célula, pero al combinarla con la falta de *KHAI*, en el fondo genético de la cepa BY4742, la fisiología de la célula se afecta drásticamente. La presencia de Nha1p (en la cepa  $\Delta nhx1$ - $\Delta kha1$ ) no pareciera sustituir la ausencia de los otros dos antiportadores. La eliminación combinada de los tres genes (*KHAI*, *NHX1* y *NHAI*), parece no afectar la viabilidad celular (Cepa construida por la Dra. Sychrova). Frente a este dato, es de pensar que la célula debe estar utilizando otro tipo de mecanismos que le permitan mantener su homeostasis interna tanto de  $K^+$  como del pH intracelular. Es posible aventurar la hipótesis de que este intercambiador (*NHX1*) esté en la vacuola y que la localización reportada (Nass y Rao, 1998) se deba a un defecto en la técnica, y que la proteína verde fluorescente (GFP) fusionada a la proteína de este antiportador  $H^+/K^+$ , impide su transporte e incorporación final a la membrana vacuolar, cosa que probablemente no ocurriría si la marca no fuera tan voluminosa y por tanto onerosa para la célula (Zeng *et al*, 2004).

Desafortunadamente, los cambios más importantes se observaron en la cepa BY4742, que no parece ser en sí suficientemente robusta. En otro trabajo del laboratorio (datos no publicados) en que se estudiaron distintas cepas “silvestres”, sin duda la menos eficiente para realizar diversas funciones fue la BY4742, de modo que los cambios observados deben tomarse con cierta reserva.

Los resultados en la cepa BY4742, podrían explicarse si Nha1p está en la vacuola, y Kha1p en la membrana plasmática, y actúan en serie para producir la salida del  $K^+$  de la célula a cambio de protones. Los intentos por localizar a Kha1p en la membrana plasmática de la célula han fracasado como anteriormente se discutió.

## Efectos de las mutaciones sobre la actividad respiratoria de las células.

Este efecto parece ser independiente de los observados en la homeostasis del  $K^+$  y del pH interno. Las mutaciones producidas en las dos cepas estudiadas; en primer lugar, porque a diferencia de los cambios encontrados respecto al transporte de  $K^+$  y movimientos de protones, en las dos cepas utilizadas hubo diferencias grandes. Por otra parte, los cambios observados, en particular con las eliminaciones de *Kha1p* y *Nha1p*, fueron muy similares entre ambas cepas, no obstante el fondo genético diferente.

**Kha1p:** La eliminación de *KHA1* aumentó la capacidad respiratoria de las células, y se demostró que ello reside en cambios de la mitocondria, con una mayor actividad en comparación con la cepa silvestre; ya que esto se observó midiendo el consumo de oxígeno después de agregar etanol a células enteras, un sustrato exclusivo de la mitocondria. Se podría especular sobre esta mayor actividad de la mitocondria como resultado de un aumento de  $K^+$  intracelular (citoplásmico), pero esta mutación simple no hizo aumentar los niveles de potasio total acumulado, no obstante el incremento de este catión tal vez sea sólo local por organelo y uno de ellos sea posiblemente la mitocondria. Se sabe, que cuando se incrementa la cantidad de fuerza iónica, el transporte de electrones que se lleva a cabo por la cadena transportadora de  $e^-$ , es más rápida (Hackenbrock *et al.*, 1986). Por tanto el incremento de  $K^+$ , tenga como consecuencia no sólo el colapso del potencial de membrana mitocondrial, sino una consecuencia directa del transporte de electrones en los complejos respiratorios. Este fenotipo observado pudiera relacionarse con la propuesta de Steinmetz *et al.* (2000), quienes afirman que este antiportador  $H^+/K^+$  sea localizado en la mitocondria. Además, este gene conserva un gran parecido con los antiportadores bacterianos (Ramírez *et al.*, 1998), y dado que este organelo tiene un origen endosimbiótico (Margulis, 2001) y

que parte de su genoma lo exportó al núcleo, es posible que sus proteínas sigan conservando su función bacteriana original.

**Nha1p:** Su ausencia, sola o combinada con la de *KHAI*, causó una disminución de la actividad respiratoria, ya antes encontrada para estas mutantes simples. Este último cambio fisiológico es importante, dado que cerca de este gene a 2 Kb río arriba se localiza el gene *SLS1*, que se ha descrito dentro del proceso de transcripción del DNA mitocondrial, ya que *Sls1p* se localiza anclada a la membrana interna mitocondrial e interactúa con *Nam1p*, la cual forma un complejo con la RNA polimerasa de la mitocondria (Bryan *et al*, 2002). La ausencia de *SLS1* produce problemas tanto respiratorios como de crecimiento en sustratos no fermentables (<http://db.yeastgenome.org/cgi-bin/SGD/locus.pl?locus=sls1>), similares curiosamente al fenotipo de la mutante en *NHAI*. Pudiera ser que lo observado sea consecuencia de cambios en los niveles de expresión del gene *SLS1*, que se viera afectado por la construcción de la mutante sin *NHAI*, que emplea el gene *HIS5<sup>+</sup>*, y cuyo tamaño modificara las distancias a las que puede actuar algún complejo de factores de transcripción sobre las regiones promotoras o de regulación (Harbison *et al.*, 2004) de expresión de *SLS1*.

**Nhx1p.** La ablación de este antiportador produjo cambios importantes en la respiración, similar al registrado en la cepa *Δkha1*, pero la eliminación de ambos genes causó un fenotipo más acentuado. Uno de estos cambios, en la doble mutante (*Δnhx1-Δkha1*) fue el aumento de la concentración de potasio intracelular, claramente mayor que el observado para estas mutantes simples como de su cepa silvestre. No lo hemos determinado, tal vez sea posible que el incremento de este catión sea local en este organelo y el  $K^+$  este modificando las actividades de la cadena transportadora de electrones. También la explicación puede estar en el mayor bombeo de  $H^+$ , que dio lugar a un mayor potencial

transmembranal, medido con CCCP y cianina (DiSC<sub>3</sub>(3)); la actividad de hidrólisis de ATP, no sea tan alto, esto también se puede explicar por un incremento de proteína de *PMA1* y no necesariamente de su actividad específica en el bombeo de protones.

Al igual que *KHA1* este antiportador, con base en estudios *in silico*, se ha propuesto que se encuentra localizado en la mitocondria (Steinmetz *et al.*, 2000). Numata *et al.* (1998), colocalizan a *NHX1* en la mitocondria fusionando al antiportador la proteína GFP, mientras el grupo de Rao (Brett, *et al.*, 2003) en otros experimentos encuentra a *NHX1* (*S. cerevisiae*) y *NHE6* (*Homo sapiens sapiens*) (Brett *et al.*, 2002) formando parte de organelos (vesículas prevacuolares) (Ali *et al.*, 2004) y no en mitocondrias. Por el momento no hay consenso con respecto a la localización de este antiportador. Ahora bien, es claro que la familia filogenética de este antiportador se divide de manera general en dos: proteínas que migran a membrana plasmática (localizada en invertebrados y vertebrados) y las que migran a los organelos (hongos y plantas) (Brett *et al.*, 2002).

## CONCLUSIONES

- Bajo estas condiciones de estudio, los tres intercambiadores catión/ $H^+$  (*KHAI*, *NHAI* y *NHXI*) no son esenciales para la levadura.
- Los intercambiadores *KHAI*, *NHAI* y *NHXI* juegan un papel secundario, tanto en la dinámica del transporte de  $K^+$ , como de la regulación del pH intracelular.
- La actividad de  $H^+$ -ATPasa de PMA1, no explica nuestros fenotipos registrados para las mutantes estudiadas.
- La ausencia simple de *NHXI* o en combinación de *KHAI*, aumentó la acumulación de  $K^+$ , la velocidad de acidificación del medio extracelular, el transporte de  $K^+$  hacia el interior, así como modificación en la regulación del pH intracelular.
- La eliminación de los antiportadores *KHAI*, *NHAI* y *NHXI* de manera simple o combinada produjo cambios en la actividad respiratoria, pudiendo estas proteínas estar también relacionadas directa o indirectamente con la mitocondria.
- La diferencia en los resultados obtenidos a partir de las dos cepas silvestres en el caso de la homeostasis del  $K^+$  y del pH interno de las células, impide por ahora llegar a conclusiones definitivas.

## PERSPECTIVAS.

- Afinar los estudios de las proteínas fusionadas a la proteína verde fluorescente para localizar los productos de los genes *KHAI*, *NHX1* y *NHAI*.
- Dado que se ha descrito a Nha1p como un intercambiador catión / H<sup>+</sup> de la membrana plasmática, es necesario estudiar el papel que pueda jugar en la homeostasis de los cationes en la mitocondria.
- El gene *NHX1* se ha localizado en el interior de la célula y no en la membrana plasmática, podría tener algún papel en la regulación de la homeostasis mitocondrial.
- Obtener y estudiar mutantes en las que se eliminen los tres genes propuestos como implicados en la regulación del pH interno de la levadura.
- Sería interesante medir tanto el RNAm, así como los niveles de proteína de Sls1p en las diferentes mutantes, así como en la cepa silvestre, para observar el nivel de expresión o regulación ante la ausencia o presencia de *KHAI*, *NHX1* y *NHAI*.
- Queda por estudiar la regulación de los genes del transporte, que comparten la propiedad de contar con un extremo carboxilo intracelular muy largo; algunos trabajos indican una influencia de esta parte de *NHAI* en la regulación del ciclo celular.
- Se ha propuesto que la vacuola desempeña un papel importante en la homeostasis del K<sup>+</sup> y del pH intracelular. Por tanto, con estas mutantes se estudiaría el papel de estos antiportadores en este organelo.

## BIBLIOGRAFÍA.

- Anand, S., Prasand, R. 1989. Rise in intracellular pH in current with "start" progression of *Saccharomyces cerevisiae*. J. Gen. Microbiol. 135:2173-2179.
- Armstrong, W. McD., Rothstein, A. 1964. Discrimination between alkali metal cations by yeast. J. Gen. Physiol. 48:61-71.
- Arnold, I., Pfeiffer, K., Neupert, W., Stuart R. A., Schägger H. 1998. Yeast mitochondrial  $F_1F_0$ -ATP synthase exists as a dimer: identification of three dimer-specific subunits. EMBO J. 17:7170-7178.
- Ali, R., Brett, C. L., Mukhherjee, S., Rao, R. 2004. Inhibition of sodium/proton exchange by a Rab-GTPase-activating protein regulates endosomal traffic in yeast. J Biol Chem. 279 (6):4498-506.
- 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.
- Bearson, S., Bearson, B., Foster, J.W. 1997. Acid stress responses in enterobacteria. FEMS Microbiol. Lett. 147:173-180.
- 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.
- Brett, C.L., Wei, Y., Donowitz, M., Rao, R. 2002. Human  $Na^+/H^+$  exchanger isoform 6 is found in recycling endosome of cells, not in mitochondria. Am J Physiol Cell Physiol. 282 (5):1031-1041.
- Broach, J. R., Pringle J. R., Jones E. W. 1991. The molecular and cellular biology of the yeast *Saccharomyces*. Genome dynamics, protein synthesis and energetics. Vol 1. Cold Spring Harbor laboratory. New York, USA.
- Brown, T. A. 1999. *Genomes*. Wiley-Liss, New York. USA.
- Bryan, A.C., Rodeheffer, M. S., Wearn, C. M., erald. Shadel, G. S. 2002. Sls1p is a membrane-bound regulator of transcription-coupled processes involved in *Saccharomyces cerevisiae* mitochondrial gene expression. Genetics 160(1): 75-82.
- Calahorra, M., Martínez, G., Hernández-Cruz, A., Peña, A. 1998. Influence of monovalent cations on yeast cytoplasmic and vacuolar pH. Yeast 14:501-515.
- 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.
- Carmelo, V., Santos, H., Sá-Correia, I. 1997. Effect of extracellular acidification on the activity of plasma membrana ATPase and on the cytosolic and vacuolar pH of *Saccharomyces cerevisiae*. Biochimica et Biophysica Acta. 1325: 63-70.
- Chopra, R., Mitra, V., S. y Ganesan, K. 1999. Elevated growth of *Saccharomyces cerevisiae* *ATH1* null mutants on glucose is an artifact of nonmatching auxotrophies of mutant and reference strains. Applied and Environmental Microbiology. 65 (5): 2267-2268.
- 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.
- 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.
- Conway, E. J., Downey, M. 1950. pH values of the yeast cell. Biochem. J. 47:355-360.
- Conway, E. J., Duggan, F. 1958. A cation carrier in the yeast cell wall. Biochem. J. 69:265-274.
- 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.

- 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.
- Conway, E. J., Ryan, H., Carton, E. 1954. Active transport of sodium ions from the yeast cell. *Biochem. J.* 58:158-167.
- Counillon, L. and Pouyssegur, J. 2000. The expanding family of eukaryotic Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchangers. *J. Biol. Chem.* 275: 1-4.
- Damaskín, B. B., Petri, O. A. 1981. Fundamentos de la electroquímica teórica. MIR, Moscú. P 331.
- 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. Genet.* 262:683-702.
- Fairman, C., Zhou, X. L., Kung C. 1999. Potassium uptake through the *TOK1* K<sup>+</sup> channel in budding yeast. *J. Membr. Biol.* 168:149-157.
- Ferreira, T., Mason, A.B., Pypaert, M., Allen, K. E., Slayman, C. W. 2002. Quality control in the yeast secretory pathway: a misfolded PMA1 H<sup>+</sup>-ATPase reveals two checkpoints. *J. Biol. Chem.* 277 (23): 21027-21040.
- Gaber, R. F., Atyles, 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.
- Garland, P. 1992. Obituary: Peter Mitchell (1920-1992). *Nature.* 35:747.
- 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.
- 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.
- Hackenbrock, C. R., Chazotte, B., Shaila, G. S., 1986. The random collision model and a critical assesment of difusion and collision in mitochondrial electron transport. *J. Bioenergetics and Biomembranes.* 18 (5): 331-368.
- Harbison, C. T., Gordon D. B., Ihn, T. L., Rinaldi, N. J., Macisaac, K. D., Danford, T.W., Hannett, N.M., Tagne Jean-Bosco, Reynolds, D.B., Yoo1, J., Jennings, E.G., Zeitlinger, J., Pokholok, K. D., Kellis, M., Rolfe, A.P., Takusagawa, K.T., Lander, E. S., Gifford, K. D., Fraenkel, E., Young, R. E. 2004. Transcriptional regulatory code of a eukaryotic genome. *Nature.* 431(2):99-104.
- 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.
- 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.
- Hervesy, G., Nielsen, N. 1941. Potassium interchange in yeast cells. *Acta. Physiol. Scand.* 2:347.
- 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.
- Johnson, J. D. y Epel, D. 1976. Intracellular pH and activation of sea urchin eggs after fertilization. *Nature* 262: 661-664.
- Ko, C.H., Buckley, A.M., and Gaber, R.F. 1990. TRK2 is required for low affinity K<sup>+</sup> transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 125:305-312.

- Kwast, K., Lai, L., Menda, N., James, D., Aref, S. Burke, P. 2002. Genomic analyses of anaerobically induced genes in *Saccharomyces cerevisiae*: functional roles of Rox1 and other factors in mediating the anoxic response. *J. Bacteriol.* 184, 1: 250-265.
- 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.
- Laidler, K. J., Meiser, J. H. 1998. *Fisicoquímica*. 2<sup>da</sup> Ed. Continental, México.
- Laguna, J. y Piña, E. 2002. *Bioquímica de Laguna*. Ed. El Manual Moderno. México.
- Lamb, T., Xu, W., Diamond, A., Mitchell, A.P. 2001. Alkaline response genes of *Saccharomyces cerevisiae* and their relationship to the RIM101 pathway. *The Journal of Biological Chemistry.* 276: 1850-1856.
- Lasnitzki, A., Szörényi E. 1934. The influence of alkali cations on the fermentation capacity of yeast. *Biochem. J.* 31:580-587.
- Latorre, R., López-Barneo, J., Bezanilla, F., Llinás, R. (Edits). 1996. *Biofísica y fisiología celular*. Universidad de Sevilla, España.
- Lewin, B. 2000. *Genes VII*, Oxford University Press. New York, USA.
- Lodish, H., Berk, A., Zipursky, L., Matsudaira, P., Baltimore, D., Darnell, J. 2000. *Molecular cell biology*. 4<sup>th</sup> Edt, Freeman and company. USA.
- Longine, 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.
- López, R., Enríquez, E., Peña, A. 1999. Effects of weak acids on cation accumulation,  $\Delta\text{pH}$  and  $\Delta\Psi$  in yeast. *Yeast.* 15:553-562.
- López, R., Peña, A. 1999. Potassium transport in yeast. *Rev. Latinoam. Microbiol.* 41:91-103.
- Madigan, M. T., Martinko, J. M., Parker, J. 1997. *Brock: biología de los microorganismos*. 8<sup>va</sup> Ed. Prentice Hall, Madrid, España.
- Margulis, L. 2001. *El origen de la célula*. Ed. Reverté.
- Mathews, C. K., Van Holde K. E. 1998. *Bioquímica*. McGraw-Hill/Interamericana. Madrid, España.
- 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.
- Miranda, M., Ramírez, J., Peña, A., Coria, R. 1995. Molecular cloning of the plasma membrane  $\text{H}^+$ -ATPase from *Kluyveromyces lactis*: a single nucleotide substitution in the gene confers ethidium bromide resistance and deficiency in  $\text{K}^+$  uptake. *J. Bacteriol.* 177:2360-2367.
- Miranda, M., Pardo, J. P., Allen, K. E., Slayman, C.W. 2002. Stalk segment 5 of the yeast plasma membrane  $\text{H}^+$ -ATPase. Labeling with a fluorescent maleimide reveals a conformational change during glucose activation. *J. Biol. Chem.* 277:40981-40988
- Mitchell, P. 1961. Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism. *Nature.* 8; 191:144-148.
- Mitchell, P. 1968. *Chemiosmotic coupling and energy transduction*. Bodmin, Cornwall; Glynn Research Ltd.
- Mitchell, P. 1978. Protonmotive chemiosmotic mechanisms in oxidative and photosynthetic phosphorylation. *TIBS.* 5: 59-61.
- 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.

**ESTA TESIS NO SALE  
DE LA BIBLIOTECA**

- Nass, R., Cunningham, K.W., Rao, R. 1997. Intracellular sequestration of sodium by endosomal compartment of yeast is enhanced by mutations in the plasma membrane  $H^+ -ATPase$ . *J. Biol. Chem.* 272:25145-25152.
- 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.
- Nelson, D. L., Cox, M. M. 2000. *Lehninger: Principles of Biochemistry*. 3th Edt, Worth publishers. New York, USA.
- Nicholls, D. G. 1987. *Bioenergética. Introducción a la Teoría Químiosmótica*. Reverté. Barcelona, España.
- Orlowski, J. and Gristein, S. 1997.  $Na^+/H^+$  exchangers of mammalian cells. *J. Biol. Chem.* 272: 22373-22376.
- 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.
- Peña, A. 1975. Studies on mechanism of  $K^+$  transport in yeast. *Arch. Biochem. Biophys.* 167:397-409.
- Peña, A., Borbolla, M., Uribe, S., Carrasco, S., Clemente, M. 1981. The effects of alkylguanidines on monovalent cation transport in yeast. *Symposium Precedings V<sup>th</sup> international of yeast*. pp 485-490.
- 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.
- 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.
- Peña, A., Ramírez, J. 1991. An energy-dependent efflux system for potassium ions in yeast. *Biochim. Biophys. Acta.* 1068:237-244.
- Peña, A., Ramírez, J., Rosas G., Calahorra, M. 1995. Proton pumping and the internal pH of yeast cells, measured with pyranine introduced by electroporation. *J. Bacteriol.* 177 (4):1017-1022.
- 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.
- Peña, A. La regulación del transporte del  $K^+$  en la levadura. En: *Los perfiles de la Bioquímica en México*. Estrada- O., S. y Martuscelli, J., Editores. 1975. UNAM, México, pp. 367-380.
- 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.
- Peña, A. 1986. Las membranas de las células. Fondo de Cultura Económica. Colección La Ciencia para todos, No 18. México. P 161.
- Peña, A., Dreyfus, G. 1990. La energía y la vida. Fondo de Cultura Económica. Colección La Ciencia para todos, No 92. México. P 98.
- Peña, A. 1995. ¿Cómo funciona una célula? Fisiología celular. Fondo de Cultura Económica. Colección La Ciencia para todos, No 122. P 121.
- Peña, A. 2001. ¿Qué es el metabolismo?. Fondo de Cultura Económica. Colección La Ciencia para todos. México, No 184. P 125.
- Phaff, H. J., Miller, M. W., Mrak, E. M. 1978. *The life of yeast*. Harvard University Press, Cambridge. USA.
- 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.
- Pulver, R., Verzar, F. 1940. Connexion between carbohydrate and potassium metabolism in the yeast cell. *Nature.* 145:823-824.
- Ramakrishnan, V. 2002. Ribosome structure and the mechanism of translation. *Cell.* 108,22:557-572.

- Ramírez, J., Peña, A., Montero-Lomelí, M. 1996. H<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> exchange in reconstituted yeast plasma membrane vesicles. *Biochim. Biophys. Acta.* 1285:175-182.
- Ramírez J., Ramírez O., Saldaña C., Coria R., Peña A. 1998. A *Saccharomyces cerevisiae* mutant lacking a K<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger. *J. Bacteriol.* 180,22: 5860-5865.
- Ramos, J., Contreras, P., Haro R., Rodríguez-Navarro, A., 1985. A potassium transport mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch. Microbiol.* 143: 88-93.
- 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.
- Ramos, J. 1999. Contrasting salt tolerance mechanism in *Saccharomyces cerevisiae* and *Debaryomyces hansenii*. *Recent. Res. Devel. Microbiol.* 3: 377-390.
- Rodríguez-Navarro, A., Ramos J. 1984. Dual system for potassium transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* 159, 3:940-945.
- Rothstein, A. 1974. Relationship of cation influxes and effluxes in yeast. *J. Gen. Physiol.* 64:608-621.
- Rothstein, A. and Demis, C. 1953. The relationship of the cell surface to metabolism. The stimulation of fermentation by extracellular potassium. *Arch. Biochem. Biophys.* 44:18-29,
- Rothstein, A., Bruce, M. 1958. The efflux of potassium from yeast cells into a potassium free medium. *J. Cell Comp. Physiol.* 51:439-455.
- Rothstein, A., Bruce M. 1958. The potassium efflux and influx in yeast at different potassium concentrations. *J. Cell Comp. Physiol.* 51:145-156.
- 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.
- Rothstein, A., Enns, L.H. 1946. The relationship of potassium to carbohydrate metabolism in baker's yeast. *J. Cell Comp. Physiol.* 28:231-252.
- Rottenberg, H., Moreno-Sánchez, R. 1993. The proton pumping activity of H<sup>+</sup>-ATPases: an improved fluorescence assay. *Biochim. Biophys. Acta* 1183:161-170.
- Ryan, J. P., Ryan, H. 1972. The role of intracellular pH in the regulation of cation exchanges in yeast. *Biochem. J.* 128:139-146.
- 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.
- Scheiner-Bobis, G. 2002. The sodium pump: its molecular properties and mechanics of ion transport. *Eur. J. Biochem.* 269: 2424-2433.
- Seto-Young, D. and Perlin, D. S. 1991. Effect of membrane voltage plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 266:1383-1389.
- Serrano, R. 1983. In vivo glucose activation of yeast plasma membrane ATPase. *FEBS Lett* 156:11-14.
- Serrano, R., Kielland-Brandt MC, Fink GR. 1986. Yeast plasma membrane ATPase is essential for growth and has homology with (Na<sup>+</sup> + K<sup>+</sup>), K<sup>+</sup>- and C<sup>2+</sup>-ATPases. *Nature* 319:689-693.
- Simón, E., Barceló A., Ariño, J. 2003. Mutagenesis analysis of the yeast Nha1 Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter carboxy-terminal tail reveals residues required for function in cell cycle. *FEBS Lett.* 545: 239-245.
- Stewart, R. D. y Robert Guy. 1999. Structural models of the KtrB, TrkH y Trk1,2 symporters based on the structure of the KcsAK<sup>+</sup> channel. *Biophys. J.* 77:789-807.
- Van Belle, D., André, B. 2001. A genomic view of yeast membrane transporters. *Curr. Op. Cell Biol.* 13:389-398.
- 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.

Venema, K., Belver, A., Marin-Manzano, M. C., Rodríguez-Rosales, M. P., Donaire, J. P. 2003. A novel intracellular  $K^+/H^+$  antiporter related to  $Na^+/H^+$  antiporters is important for  $K^+$  ion homeostasis in plants. *J Biol Chem.* 278 (25):22453-22459.

Walker, G. M. 1998. *Yeast physiology and biotechnology*. John Wiley and sons. Chichester, England.

Wang, H., Oster, G. 1998. Energy transduction in the  $F_1$  motor of ATP synthase. *Nature.* 396 (19):279-282.

Yasuda, R., Noji, H., Kinosita, K., Yoshida, M., 1998.  $F_1$ -ATPase is a highly efficient molecular motor that rotates with discrete  $120^\circ$  steps. *Cell.* 93:1117-1124.

Zeng G.F., Pypaert M., Slayman C. L. 2004. Epitope tagging of the yeast  $K^+$  carrier Trk2p demonstrates folding that is consistent with a channel-like structure. *J Biol Chem.*; 279 (4): 3003-3013.

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=nha1>

<http://genome-www4.stanford.edu/cgi-bin/SGD/locus.pl?locus=trk1>

<http://genome-www4.stanford.edu/cgi-bin/SGD/locus.pl?locus=trk2>

<http://genome-www4.stanford.edu/cgi-bin/SGD/locus.pl?locus=nhx1>

<http://genome-www4.stanford.edu/cgi-bin/SGD/locus.pl?locus=sls1>