

00591



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO
FACULTAD DE QUÍMICA

Estudio *in situ* del transporte del
ion potasio a la vacuola de
Saccharomyces cerevisiae

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
DOCTORA EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

PRESENTA:
M. en C. GLORIA ANGÉLICA MARTÍNEZ MUÑOZ

DIRECTOR DE TESIS:
DR. ANTONIO PEÑA DÍAZ



MÉXICO, D. F.

2005

0346442



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

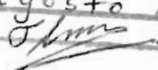
Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

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.

JURADO

PRESIDENTE
VOCAL
VOCAL
VOCAL
SECRETARIA
SUPLENTE
SUPLENTE

Dr. Edmundo Chávez Cossío
Dr. Blas Lotina Henssen
Dra. Marina Gavilanes Ruíz
Dr. Juan Pablo Pardo
Dra. Xóchitl Pérez Martínez
Dr. Roberto Coria Ortega
Dr. Salvador Uribe Carvajal

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.
NOMBRE: Gloria Angélica Martínez Muñoz
FECHA: 1º agosto 2005
FIRMA: 

La presente investigación se desarrolló bajo la dirección del Dr. Antonio Peña Díaz, en el Departamento de Genética Molecular del Instituto de Fisiología Celular, UNAM.

Agradecimientos

Con profundo agradecimiento al Dr. Antonio Peña Díaz por su gran ejemplo y el apoyo otorgado en todo momento.

A los miembros del comité tutorial: Dr. Heliodoro Celis Sandoval y el Dr. Blas Lotina Hensen, por la ayuda brindada.

A los miembros del Jurado: Dr. Edmundo Chávez Cosío, Dr. Juan Pablo Pardo, Dra. Marina Gavilanes Ruíz, Dra. Xóchitl Pérez Martínez, Dr. Salvador Uribe Carvajal y Dr. Roberto Coria Ortega, por la revisión a este trabajo y sus valiosos comentarios.

A mis amigas Martha Calahorra y Norma Sánchez por el apoyo técnico siempre presente en el laboratorio.

A mi amigos Fernando Arroyo y Araceli Patrón por su apoyo en la obtención de las imágenes confocales.

Con mucho cariño a mis compañeros de laboratorio y del Depto.: Marissa Calderón, Daniela Castro, Christian Cárdenas, Carlos Flores, Juan Carlos González, Andrés Rojas, Victoriano Pérez y Laurita Kawasaki, por todas las inolvidables experiencias compartidas.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología de México (CONACYT) por la beca otorgada para la realización de la presente investigación.

Dedicatorias

Adorada y hermosa hijita Carolina, ¡lo logramos!

Con eterno cariño y agradecimiento a mis queridísimos
padres Armando y Amalia,

A Salvador, con profundo amor y agradecimiento,

A mis maravillosas hermanas Paty y Mayita,

A mis sobrinitos Luis y Michell,

Con profundo amor a mi abuelita Lupita,

Y muy especialmente al Dr. Alfredo Herrera Estrella, por su
ejemplo y amistad inigualables

ÍNDICE

	PÁGINA
Lista de Tablas	7
Lista de Figuras	8
Resumen	9
Abstract	10
Abreviaturas	11
1. Introducción	13
1.1. La levadura como modelo biológico	13
1.2. La membrana plasmática de <i>S. cerevisiae</i>	14
1.3. El transporte a través de las membranas biológicas	18
1.4. El transporte del K ⁺ en la levadura	21
1.5. La vacuola: estructura y función	27
1.5.1. La membrana vacuolar	28
1.5.2. Enzimas asociadas a tonoplasto	30
1.5.3. Enzimas vacuolares degradativas	31
1.5.4. Biogénesis vacuolar: vías de transporte de proteínas a la vacuola	32
1.5.5. Compartimento prevacuolar	34
1.6. Técnicas de estudio de la vacuola	35
1.6.1. Aislamiento de la vacuola	35
1.6.2. Levaduras permeables	36
1.6.3. Esferoplastos permeables	36
1.7. La pared celular de las levaduras	37
1.8. V-ATPasas, estructura y función	39
1.9. Transportadores vacuolares	41
1.10. El antiportador Na ⁺ /H ⁺ Nhx1p	42
1.11. Hipótesis de Trabajo	44
1.12. Objetivos de la presente investigación	44
2. Materiales y Métodos	45
2.1. Cepas y condiciones de cultivo	45
2.2. Preparación de esferoplastos	45
2.3. Preparación de vacuolas	46
2.4. Potencial de membrana plasmática	47
2.5. Respiración	47
2.6. Flujo de nucleótidos en esferoplastos	47
2.7. Flujo de proteínas en esferoplastos	48
2.8. Ensayo de glucosa 6-fosfato deshidrogenasa	48
2.9. Producción de NADH en esferoplastos	48
2.10. Contenido de potasio intracelular	48
2.11. Actividad de ATPasa	49
2.12. Transporte de K ⁺ en los esferoplastos	49
2.13. Potencial de membrana vacuolar	49
2.14. Electroporación de las células completas con piranina	50
2.15. Introducción de la piranina a la vacuola de células intactas	50

2.16. Introducción de la piranina a la vacuola de los esferoplastos y a vacuolas aisladas	50
2.17. Medida del pH vacuolar en esferoplastos y vacuolas aisladas	51
2.18. Microscopía confocal	51
2.19. Proteína	51
2.20. Reactivos	52
3. Resultados	53
3.1 Efecto de la nistatina sobre la permeabilidad de las levaduras intactas	53
3.2. Respiración mitocondrial en los esferoplastos	54
3.3. Potencial de la membrana plasmática	58
3.4. Producción de NADH	59
3.5. Liberación de nucleótidos, proteínas y actividad de enzimas citoplásmicas	61
3.6. Cuantificación del potasio en los esferoplastos (potasio vacuolar)	63
3.7. Actividad de las ATPasas	64
3.8. Transporte del potasio en los esferoplastos	65
3.9. Potencial de la membrana vacuolar	66
3.10. pH vacuolar	68
3.11. El pH vacuolar en esferoplastos de las mutantes <i>Δnhx1</i>	76
4. Discusión	79
4.1. Propiedades de los esferoplastos	79
4.2. Efecto de la zimoliasa en la membrana plasmática	80
4.3. Consumo de oxígeno	84
4.4. La permeabilidad de los esferoplastos	85
4.5. Aplicación al estudio <i>in situ</i> del transporte vacuolar y otros	86
4.6. Potasio interno	86
4.7. Actividad de ATPasas	87
4.8. pH vacuolar	88
4.9. El transporte del K ⁺ a la vacuola	89
4.10. La vacuola y su papel en la regulación del pH interno de la levadura	91
4.11. Transporte de K ⁺ a la vacuola de mutantes <i>Δnhx1</i>	92
5. Conclusiones	94
6. Referencias	95
7. Anexo	114

Manuscrito:

"*In situ* study of potassium transport into the vacuole of *Saccharomyces cerevisiae*".
Martínez-Muñoz, G.A., and Peña, A. 2005. *Yeast* 22:689-704. Publicado.

LISTA DE TABLAS

TABLA	TÍTULO	PÁGINA
I	Actividades enzimáticas asociadas a la vacuola de <i>S. cerevisiae</i>	31
II	Propiedades de algunas ATPasas en <i>S. cerevisiae</i>	40
1	Respiración de esferoplastos con lactato e incubados con nistatina	55
2	Velocidad de consumo de oxígeno en esferoplastos con distintos sustratos	56
3	Velocidad de consumo de oxígeno en levaduras	57
4	Contenido de K ⁺ (μequiv./g peso húmedo) en levaduras intactas y esferoplastos (vacuolar)	63
5	Actividad de ATPasa en esferoplastos de La Azteca	65

LISTA DE FIGURAS

FIGURA		PAGINA
A	Estructura molecular de la nistatina y la anfotericina B	17
B	Mecanismos de transporte de K^+/Na^+ en <i>S. cerevisiae</i>	25
C	Vías de transporte de proteínas a la vacuola de la levadura	34
1	Potencial de la membrana plasmática en levaduras intactas y tratadas con nistatina	53
2	Potencial de la membrana plasmática en levaduras intactas y esferoplastos	59
3	Producción de NADH en esferoplastos y levaduras	60
4	Liberación de nucleótidos, proteínas y actividad de glucosa 6-fosfato deshidrogenasa durante la formación de esferoplastos	62
5	Transporte de ion potasio en esferoplastos de La Azteca	66
6	Potencial de la membrana vacuolar en los esferoplastos	67
7	Entrada de la piranina a la vacuola en los esferoplastos	69
8	pH vacuolar en esferoplastos	70
9	Efecto del KCl sobre el pH vacuolar en esferoplastos y en vacuolas aisladas en ausencia de $ATP-Mg^{2+}$	71
10	Efecto de cationes monovalentes-alcalinos sobre el pH vacuolar en los esferoplastos	73
11	pH vacuolar de levaduras completas y efecto del potasio y otros cationes	75
12	pH vacuolar en esferoplastos de la mutante $\Delta nhx1$ y efecto de iones potasio y cationes monovalentes-alcalinos	77

RESUMEN

El K^+ es un catión fundamental para la vida y desarrollo de *Saccharomyces cerevisiae*. Este ion acelera la glucólisis y la respiración, regula el potencial de la membrana plasmática y juega un papel importante en la regulación del pH interno de la levadura. Por otra parte, la vacuola es el organelo que almacena la mayor parte del K^+ de la levadura. A la fecha ha sido descrito solamente un antiportador Na^+/H^+ en la membrana vacuolar de *S. cerevisiae*. Sin embargo, poco se sabe del transporte del K^+ a este organelo. Dado que la adición de K^+ a la levadura provoca la alcalinización vacuolar y además existen diversos antiportadores catión/protón en la vacuola, la hipótesis de este trabajo supone la existencia de un antiportador K^+/H^+ en la vacuola de la levadura. El objetivo principal de esta investigación fue llevar a cabo el estudio *in situ* del transporte del K^+ a la vacuola de esta levadura. Se desarrolló una técnica para preparar esferoplastos permeabilizados en dos cepas de *S. cerevisiae* (La Azteca y BY4742). Las levaduras no requirieron de agente permeabilizante sino únicamente de la incubación con zimoliasa. De hecho, la incubación con nistatina provocó el desacoplamiento de las mitocondrias, lo cual se observó por mediciones de la respiración mitocondrial en los esferoplastos. La pérdida de la barrera de la membrana plasmática en los esferoplastos fue confirmada por la liberación de nucleótidos y proteínas, así como por la actividad de la glucosa 6-fosfato deshidrogenasa con sustrato externo; también se observó la pérdida del potencial de la membrana plasmática y de la capacidad glucolítica por la liberación de los cofactores necesarios de la glucólisis. Sin embargo, los organelos internos se mantuvieron íntegros, y se encontró respiración mitocondrial acoplada a la fosforilación del ADP con sustratos como lactato, piruvato, glucosa y etanol.

La integridad vacuolar permitió la cuantificación del potasio interno; se confirmó la capacidad de almacenamiento de este catión que tiene la vacuola y su probable papel en la homeostasis del mismo. Se cuantificó la actividad de las H^+ -ATPasas plasmática, vacuolar y mitocondrial, mediante inhibidores específicos. La primera fue la más activa, seguida por la vacuolar, y no se detectó la ATPasa mitocondrial. Con un electrodo selectivo se observó la toma del ion potasio por los esferoplastos, el cual se inhibió con la bafilomicina A_1 , inhibidor específico de la V-ATPasa. La adición de un inhibidor de antiportadores Na^+/H^+ (un derivado de la amilorida) provocó la salida masiva del potasio vacuolar. Mediante colorantes fluorescentes se pudo estimar el ΔpH y el $\Delta \psi$ de la membrana vacuolar. El $\Delta \psi$ aumentó con la adición de ATP- Mg^{2+} , se colapsó con desacoplantes y se inhibió con bafilomicina A_1 . La ausencia del efecto del ion potasio sobre el $\Delta \psi$ sugirió que su entrada a la vacuola se daba por un antiportador electroneutro del tipo K^+/H^+ . Se cuantificó el pH vacuolar con piranina y se encontró una acidificación vacuolar con ATP- Mg^{2+} , que se inhibió con bafilomicina A_1 . El K^+ provocó la alcalinización vacuolar, pero se requirieron altas concentraciones del ion potasio de hasta diez veces por arriba que el que afecta el pH citoplásmico. El transportador vacuolar es inespecífico. Las mismas características de los esferoplastos se observaron en el transporte de potasio usando vacuolas aisladas.

Con el fin de evaluar el papel del antiportador Na^+/H^+ Nhx1p en el transporte de potasio en la vacuola, se utilizaron mutantes $\Delta nhx1$ y se caracterizó en éstas el transporte del K^+ en cuanto a su especificidad y concentración requerida. Los resultados mostraron que esta proteína no es la encargada de llevar a cabo el transporte del ion potasio en este organelo. Se requieren más estudios para conocer la naturaleza de dicho antiportador vacuolar.

ABSTRACT

K^+ is an important cation for the life of *Saccharomyces cerevisiae*. This cation accelerates the glycolysis and respiration, regulates the potential of plasma membrane and plays an important role in the regulation of the internal pH in the yeast. By other hand, the vacuole is the main storage of K^+ in the yeast. A Na^+/H^+ antiporter has been described in the vacuole of *S. cerevisiae*, however more studies are necessary about the potassium transport in this organelle. In view of the vacuolar alkalization caused by K^+ in *S. cerevisiae* and of the existence of several antiporters ion/proton in the vacuole of this organism, the hypothesis of this work supposed the existence of a K^+/H^+ antiporter in the vacuole.

The main objective of this work was to allow an *in situ* study of the K^+ transport in the vacuole of *S. cerevisiae*. A technique for obtaining permeabilized spheroplasts was prepared in this work in two strains of *S. cerevisiae* (La Azteca and BY4742). Intact yeast did not require any permeabilizing agent but only the incubation with zymolyase. In fact, incubation with nystatin produced mitochondrial uncoupling, which was observed by mitochondrial respiration measurements in spheroplasts. The loss of the plasma membrane integrity was confirmed by the release of nucleotides and proteins and by the glucose-6-phosphate dehydrogenase activity with exogenous substrates in spheroplast. Decline of plasma membrane potential was observed and spheroplasts lost glycolytic ability due to the release of cofactors of glycolysis. However, internal organelles maintained their integrity and mitochondrial respiration was coupled to ADP phosphorylation in presence of substrates such as lactate, pyruvate, glucose and ethanol.

Vacuolar integrity allowed quantification of internal potassium; the storage ability of the vacuole was confirmed and also its probable role in the homeostasis of potassium ions in the yeast. Plasmatic, vacuolar and mitochondrial H^+ -ATPase activities were quantified by specific inhibitors. The first one showed the highest activity, followed by the vacuolar enzyme, but mitochondrial H^+ -ATPase activity was not detected. Entrance of potassium into the spheroplasts was observed with a selective electrode which was inhibited by bafilomycin A_1 , a specific inhibitor of V-ATPase. Besides, addition of a specific inhibitor of Na^+/H^+ antiporters (amiloride derivative), provoked the massive efflux of the vacuolar potassium. ΔpH and $\Delta \psi$ were estimated in the vacuolar membrane by fluorescent dyes. $\Delta \psi$ increased after $ATP-Mg^{2+}$ addition, reverted by uncouplers and inhibited with bafilomycin A_1 . The absence of a potassium ion effect on $\Delta \psi$ suggested that the entrance of this cation to the vacuole is driven by an electroneutral K^+/H^+ antiporter. Vacuolar pH was quantified by pyranine fluorescence and vacuolar acidification was observed after $ATP-Mg^{2+}$ addition but inhibited by bafilomycin A_1 . K^+ promotes vacuolar alkalization in a process that required tenfold higher potassium concentration than in the case of the cytoplasmic alkalization. Potassium transport into the vacuole was nonspecific. Same potassium transport properties in the spheroplasts were observed in isolated vacuoles.

With the aim of evaluating the role of the Na^+/H^+ antiporter Nhx1p on potassium transport in the vacuole, $\Delta nhx1$ mutants were used and the potassium transport into the vacuole was characterized. Results showed that such protein is not involved in the potassium transport in this organelle. More studies are required to know the nature of such vacuolar antiporter.

ABREVIATURAS

CCCP: carbonilcianuro 3-clorofenilhidrazona

CPV: compartimentos prevacuolares

DES: dietilestilbestrol

DiSC₃(3): 3-3'-dipropiltiocarbocianina

Piranina: ácido (8-hidroxi-1,3,6-pireno-trisulfónico)

TEA: Trietanolamina

YPD: yeast, peptone and dextrose (extracto de levadura, peptona y glucosa)

V-ATPasa: H⁺-ATPasa vacuolar

$\Delta\mu_{\text{H}^+}$: diferencia de potencial electroquímico de protones

ΔpH : gradiente de pH

$\Delta\psi$: potencial de membrana

1. INTRODUCCIÓN

1.1. LA LEVADURA COMO MODELO BIOLÓGICO

La investigación científica en *Saccharomyces cerevisiae* debe sus inicios a que desde épocas tempranas de la humanidad se utiliza en la producción de bebidas alcohólicas y en la elaboración del pan. Además, los estudios en torno a la fermentación alcohólica durante los siglos diecinueve y veinte fueron trascendentes para comprender el funcionamiento celular; los descubrimientos revolucionaron la visión científica de los seres vivos dando inicio a la bioquímica y a la microbiología moderna.

En 1789, A.L. Lavoisier, el fundador de la química moderna, realizó el primer análisis químico de la fermentación alcohólica, aunque para esa época todavía no se consideraba a la levadura como un ser viviente. Después de la ejecución de Lavoisier en 1794, durante la revolución Francesa, el nuevo régimen francés ofreció un enorme apoyo a la investigación en torno a la producción de alcohol. De hecho, en el año de 1795, se ofreció un kilogramo de oro al científico que lograra dilucidar la naturaleza de los materiales que hacían posible la fermentación alcohólica, dando lugar a avances considerables al respecto (Barnett, 1998).

Algunos científicos hicieron importantes aportaciones; Gay-Lussac estableció en 1815 la ecuación de la fermentación que muestra la transformación de glucosa en dos moléculas de alcohol y dos de bióxido de carbono. Posteriormente, el avance del microscopio óptico permitió la observación de las levaduras. Desmazières publicó dibujos de los microbios de la cerveza a los que denominó *Mycoderma cervisiae* (*cervisia*, *cervesia* o *cerevisia* son palabras en latín de cerveza) entre los que se observan algunos con forma de levadura. Desmazières consideró a éstos como organismos vivos pero no les atribuyó la actividad fermentativa. Más adelante, entre 1836 y 1838, varios científicos como Cagniard-Latour, F.T. Kützing y Theodor Schwann, propusieron que la levadura era en realidad un organismo vivo. Se les aplicó entonces el término *Saccharomyces* el cual proviene del griego (azúcar + hongo); también se utilizó por primera vez el término “metabolismo” al conocer la naturaleza celular de los mismos. Se

INTRODUCCIÓN

consideraba a la levadura un organismo vivo, pero se creía que se trataba de una planta y no de un “microbio” (Barnett, 1998).

Muchos otros científicos colaboraron en la descripción de la levadura; sin embargo, fueron los estudios de Louis Pasteur los que marcaron los principios fundamentales de la fermentación. Entre los años 1855 y 1875 Pasteur logró establecer los siguientes principios: a) el papel de la levadura en la fermentación alcohólica, b) la fermentación como un fenómeno fisiológico y, c) las diferencias entre la utilización aeróbica y anaeróbica del azúcar por las levaduras. Hacia 1880 todavía no se entendía bien la fermentación alcohólica como producto de la actividad fisiológica de las levaduras, porque no se distinguía entre la actividad enzimática y las actividades generales de una célula viviente. El entendimiento de cada una de estas actividades se fue aclarando a partir de los experimentos de los hermanos Büchner a finales del siglo diecinueve, para desarrollarse en el siglo veinte con el análisis más detallado del metabolismo (Barnett, 2000).

Durante más de un siglo la levadura ha mostrado características especiales que la han convertido en un modelo más que adecuado para la investigación científica, y hoy en día la levadura es uno de los modelos de célula eucariota utilizada en estudios biológicos y celulares. Es un microorganismo inocuo que crece a gran velocidad y en medios simples, por lo que es posible obtener una gran cantidad de material biológico en poco tiempo. Su metabolismo fermentativo facultativo hace posible el estudio tanto de la fermentación como de la respiración, además de que su crecimiento y división pueden controlarse eficientemente ajustando las condiciones del medio. Se conocen prácticamente todas sus vías metabólicas; hay técnicas de aislamiento para sus organelos, y es un microorganismo genéticamente bien definido cuya secuencia genómica completa ha sido dilucidada. Existen varias bases de datos accesibles al respecto (Mager y Winderickx, 2005) lo que ha dado lugar a una explosión en los últimos años en el estudio de la genómica de este microorganismo.

1.2. LA MEMBRANA PLASMÁTICA DE *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

La capa más externa de las levaduras es la pared celular, que mantiene la estructura y la resistencia de la célula, pero es libremente permeable a solutos de peso molecular menor a 600

INTRODUCCIÓN

Da (Scherrer *et al.*, 1974). La membrana plasmática forma una barrera impermeable a las moléculas hidrofílicas y en las que existen proteínas especializadas que median la entrada selectiva y/o la secreción de solutos a través de esta membrana. El transporte de solutos a través de las membranas de la levadura ha sido estudiado desde 1930 (Collander *et al.*, 1931), pero los mecanismos del transporte de solutos recibieron atención a partir de la década de 1940-50, para llegar a definirlos sólo después de la teoría quimiosmótica de Mitchell (1963).

La membrana plasmática forma una bicapa lipídica de aproximadamente 7.5 nm de grosor; contiene una mezcla de lípidos polares y proteínas, las cuales, gracias a sus interacciones, gobiernan su estructura. El modelo clásico de Singer y Nicholson (1972) describe a la membrana como un mar continuo de lípidos, con proteínas globulares embebidas, que pueden moverse sin restricción dentro del plano de la membrana. Además, las proteínas también son capaces de llevar a cabo movimientos de rotación y de translocación (*flip-flop*). En ocasiones, sin embargo, las proteínas pierden su movimiento lateral debido a que se asocian con otras proteínas o elementos del citoesqueleto o con la matriz extracelular. Otra característica sobresaliente es la distribución asimétrica de las proteínas en la membrana. Algunas cruzan la membrana (integrales), mientras que otras se encuentran embebidas sólo parcialmente y protruyen en un solo lado de la membrana (extrínsecas).

La membrana plasmática contiene proteínas involucradas en el transporte de solutos, transducción de señales, anclaje del citoesqueleto y síntesis de componentes externos a la membrana. Los lípidos de la membrana plasmática están dispuestos asimétricamente en ambos lados de la bicapa. La capa interna de la membrana plasmática es más rica en fosfatidiletanolamina (PE), fosfatidilinositol (PI) y fosfatidilserina (PS). Una característica sobresaliente de los lípidos de la membrana plasmática es su diversidad en tamaño y composición. Las principales clases son los glicerofosfolípidos, esfingolípidos y esteroides (van de Rest *et al.*, 1995). Los glicerofosfolípidos constan de dos cadenas de acil-ácido graso unidas por un grupo éster a un glicerol 3-fosfato. Varios grupos pueden unirse al grupo fosfato como colina (en la PC), etanolamina (en la PE), serina (en la PS), mioinositol (en el PI) y glicerol (en el PG). Los esfingolípidos tienen un esqueleto de ceramidas que se compone de una larga

cadena de fitoesfingosina *N*-acetilada con un ácido graso hidroxilado- C_{26} . *S. cerevisiae* contiene sólo esfingolípidos de ceramida de inositol-fosfato y ceramida de manosil-diinositolfosfato.

Los esteroides son moléculas hidrofóbicas rígidas con un grupo hidroxilado. En contraste con los eucariotes superiores, en los cuales el colesterol es el esteroide más abundante, la membrana plasmática de levaduras contiene principalmente ergosterol y cantidades menores de zosterol (Zinser *et al.*, 1991). La vía de los isoprenoides provee diversas clases de moléculas requeridas para la biosíntesis del ergosterol, pero también provee de metabolitos involucrados en la síntesis de proteínas, la glicosilación de proteínas y el transporte de electrones. En los eucariotes superiores y probablemente también en *S. cerevisiae*, el retículo endoplásmico es el principal sitio de síntesis de esteroides. La biosíntesis de esteroides parte del acetato. El principal punto de regulación en la síntesis de isoprenoides es la conversión del 3-hidroxilado-3-metilglutaril (HMG) coenzima A en ácido mevalónico (van de Rest *et al.*, 1995). Dada la importancia del ergosterol en la sensibilidad de las membranas celulares a la nistatina, se describen a continuación algunos aspectos importantes de los esteroides a los cuales pertenece el ergosterol.

Los esteroides determinan en gran medida la rigidez de la membrana plasmática, lo cual, en consecuencia, afecta el movimiento lateral y la actividad de las proteínas de la membrana. La presencia de dominios ricos en esteroides en la membrana plasmática se ha corroborado por los efectos de la nistatina sobre la cinética de Arrhenius de la ATPasa plasmática y de la quitin sintasa en mutantes de esteroide (sin esteroide en la membrana plasmática (Bottema *et al.*, 1983). La nistatina separa la bicapa de lípidos al acomplejarse con el ergosterol; sin embargo, no tiene efecto sobre la actividad de la H^+ -ATPasa, en contraste con la quitin cinasa, cuya actividad se reduce con este compuesto. Por eso, se ha postulado que la H^+ -ATPasa se encuentra localizada en un dominio pobre en esteroides (Bottema *et al.*, 1983).

La nistatina y la anfotericina B son antibióticos antifúngicos que permeabilizan una gran variedad de células eucariotas entre los que destacan los hongos y las células de mamíferos (Bolard, 1986). Ambos compuestos presentan una estructura muy similar por lo que se cree que los mecanismos que subyacen en su interacción con las membranas celulares son muy similares también (Fig. A). La toxicidad selectiva de estos antibióticos poliénicos contra los hongos proviene de su capacidad para unirse con mayor afinidad al ergosterol, el esteroide más

cadenas hidrofóbicas de los fosfolípidos (De Kruiff y Demel, 1974). En esta configuración, la parte lipofílica de los antibióticos entra en contacto con las cadenas alifáticas de los fosfolípidos, mientras que la parte polar de los mismos se localizan en el interior del poro, formando puentes de hidrógeno con las moléculas de agua. Esta organización provee de las condiciones necesarias para dar mayor rigidez a la membrana lipídica. Lo anterior responde al hecho de que las cadenas acilo de los fosfolípidos interactúan a través de fuerzas de Van der Waals con los antibióticos (Fujii *et al.*, 1997).

Anteriormente se consideraba que los antibióticos eran incapaces de formar poros en una membrana libre de esteroides (Cass *et al.*, 1970). Hoy en día es claro que este fenómeno se presenta aún en ausencia de dichos componentes (Fournier *et al.*, 1998; Gagos *et al.*, 2001). Sin embargo, la presencia de ergosterol o colesterol modifica la estructura del poro debido a la interacción de estos compuestos con los antibióticos. Diversos estudios se han llevado a cabo tratando de dilucidar las diferencias en cuanto a la interacción de anfotericina B y nistatina con el ergosterol y el colesterol (De Kruiff *et al.*, 1974; De Kruiff y Demel, 1974; Fournier *et al.*, 1998). El consenso es que ambos antibióticos presentan una mayor afinidad por el ergosterol (Fournier *et al.*, 1998).

Sin embargo, a pesar de su gran afinidad por el ergosterol, el tratamiento de diversos tipos de micosis con dichos antibióticos, provoca serios efectos secundarios entre los que destaca la toxicidad renal (Chabot *et al.*, 1989; Tolins y Raji, 1988; Gardner *et al.*, 1990). Dicha toxicidad responde a la interacción que la anfotericina B y la nistatina presentan con el colesterol contenido en las membranas celulares del paciente. Lo anterior ha llevado al desarrollo de vesículas lipídicas que contengan en su interior a dichos antibióticos. La aplicación de estas preparaciones farmacéuticas favorece la liberación de los antibióticos en el tejido blanco y disminuye la toxicidad (Ng y Wasan, 2003).

1.3. EL TRANSPORTE A TRAVÉS DE LAS MEMBRANAS BIOLÓGICAS

El estudio de las actividades eléctricas en las células lo iniciaron los fisiólogos en el siglo XIX quienes realizaron importantes contribuciones en el estudio del movimiento de iones a

INTRODUCCIÓN

través de las membranas biológicas (Van't Hoff, 1877; Gryns, 1896). Posteriormente, el desarrollo de la bioenergética comenzó en la década de los veinte y comenzó a ser de interés también para biólogos, microbiólogos y bioquímicos (Grendel, 1929; Höber, 1936).

La circulación de iones a través de las membranas biológicas es uno de los procesos fundamentales en la energética celular. Fenómenos tan comunes como la respiración y fotosíntesis capturan energía a través de gradientes iónicos transmembranales (Skulachev, 1971). La interconversión de energía química, osmótica y eléctrica está mediada por gradientes iónicos transmembranales los cuales soportan un enorme espectro de funciones fisiológicas (Ernster y Lee, 1964).

El mecanismo por el cual la célula sintetiza ATP era aun un misterio a principio de los años sesenta. Sin embargo, sí se sabía de la relación existente entre dicho mecanismo y la membrana interna de la mitocondria (Slater, 1953). Es decir, de la cadena respiratoria en la mitocondria y el complejo de la ATP-sintasa. Se sabía que esta última era la responsable de la síntesis de ATP y que utilizaba la energía libre de la oxidación en la cadena respiratoria. Sin embargo, la naturaleza de la conexión entre ambos fenómenos, exergónico y endergónico respectivamente, se mantuvo desconocida a lo largo de varios años (Harold, 1986). La teoría más fuerte suponía la existencia de un donador de alta energía que servía de enlace entre ambos fenómenos (Slater, 1953).

La teoría de Mitchell revolucionó la idea que se tenía al respecto. De acuerdo con su teoría, el transporte de electrones a través de la cadena respiratoria y la fosforilación no se encontraban químicamente ligados, sino acoplados por una corriente de protones transmembranal (Mitchell, 1961, 1963). La cadena respiratoria genera un gradiente de pH y de potencial eléctrico a través de la membrana de la mitocondria. Por su parte, la ATP-sintasa es una segunda vía de translocación de protones, que utiliza la diferencia del potencial electroquímico de los protones para llevar a cabo la fosforilación del ATP.

La hipótesis quimiosmótica, formulada inicialmente para resolver un problema específico acerca de la fosforilación del ADP, pudo ser observada tiempo después como una teoría aplicable a muchas otras funciones, en particular, a la acumulación de iones y metabolitos

INTRODUCCIÓN

(Mitchell, 1961, 1963, 1972). Por lo que la teoría trata no solamente de la fosforilación oxidativa, sino del papel de las corrientes iónicas en la energética celular, representando uno de los conceptos más fuertes que unifican a la bioenergética.

De acuerdo con la teoría de Mitchell, existen dos tipos de transporte a través de la membrana de las células; uno ocurre por difusión simple y el otro es mediado a través de proteínas.

A) En la difusión simple no se requiere la participación de proteínas de membrana. El metabolito en cuestión es soluble en la membrana celular, por lo que difunde libremente a través de ella a favor de su gradiente de concentración. Ejemplos de esto son el O_2 , CO_2 y NH_3 (Harold, 1986).

B) El transporte mediado por proteínas se clasifica en:

1.- Difusión facilitada. Existen casos en que una proteína transportadora puede permitir el paso de sustancias de manera específica, de acuerdo simplemente con las diferencias de su gradiente electroquímico a través de la membrana. Ejemplo: transporte de glucosa en la membrana plasmática de la levadura (Elbing *et al.*, 2004).

2.- Translocadores primarios. Son sistemas de transporte conectados directamente a fuentes de energía: ATPasas de iones, bombas de la cadena respiratoria, bombas energizadas por luz. Además de mover, generalmente iones, producen una diferencia del potencial electroquímico transmembranal, que puede ser utilizada para el transporte de otras sustancias a través de los translocadores secundarios. Son ejemplos las $Na^+ - K^+ - ATPasa$ en las células de mamíferos (Skou *et al.*, 1965; Cereijido *et al.*, 2001) y la $H^+ - ATPasa$ de la membrana plasmática de la levadura (Serrano *et al.*, 1986).

Las bombas de protones, que son un ejemplo de translocadores primarios, generan una diferencia de potencial eléctrico y un gradiente de pH a través de la membrana. Ambos gradientes contribuyen a la diferencia de potencial electroquímico de protones ($\Delta\mu_H^+$). Esta es la fuerza que tiende a empujar a los protones de regreso a través de la membrana, en dirección contraria a la que están siendo bombeados originalmente. Por lo tanto, la energía metabólica se

conserva en el $\Delta\mu_{H^+}$ y la ecuación que relaciona este parámetro con la energía libre de Gibbs, que se traduce como la energía disponible para realizar un trabajo es:

$$\Delta G = \Delta\mu_{H^+} = F \Delta\psi + 2.3RT \log \frac{[H^+]_i}{[H^+]_o} \quad (1)$$

F, R y T son: la constante de Faraday, la constante de los gases y la temperatura absoluta, respectivamente. Si a 25°C, $2.3RT/F=59$ mV y si $\Delta pH = pH_i - pH_o$, el término $\Delta\mu_{H^+}/F$ puede ser expresado también como:

$$\Delta\mu_{H^+}/F = \Delta p = \Delta\psi - 59 \Delta pH \quad (2)$$

en el que Δp es la fuerza protomotriz, que es la donadora de energía para realizar el trabajo y el $\Delta\psi$ es el potencial de membrana, que es la diferencia de carga eléctrica entre ambos lados de la membrana en cuestión (Harold, 1986).

3.- Translocadores secundarios, uniportadores. Permiten el paso de un soluto a favor del gradiente de concentración. Ejemplo de éste: transporte de glucosa en eritrocitos (Baker y Naftalin, 1979) y los transportadores Trk1p y Trk2p que acarrean K^+ en la membrana plasmática de la levadura (Rodríguez-Navarro y Ramos, 1984).

4.- Translocadores secundarios, antiportadores. También llamados intercambiadores, son proteínas que aprovechan diferencias importantes en la concentración de un ion para mover otro en un intercambio. Ejemplo: el antiportador Na^+/H^+ en la membrana plasmática de la levadura (Bañuelos *et al.*, 1998).

5.- Translocadores secundarios, simportadores. También llamados contransportadores, aprovechan la tendencia de un ion a través de la membrana, para que, de acuerdo con su potencial electroquímico, mover a otro en el mismo sentido. Ejemplo: simportadores Na^+/H^+ en la membrana plasmática de células animales (Crane, 1965; Orłowski *et al.*, 1992).

1.4. EL TRANSPORTE DE K^+ EN LA LEVADURA

Todas las células contienen altas concentraciones de potasio. En el caso de *S. cerevisiae*, esta levadura almacena altas concentraciones de este ion (200-300 mM). El transporte de K^+ a

INTRODUCCIÓN

través de la membrana plasmática ha estudiado extensivamente en la levadura sin embargo, a la fecha, aún falta definir gran parte de la función y la regulación de los distintos transportadores que han sido descritos.

El ion potasio es uno de los cationes más importantes para el desarrollo y multiplicación de la levadura. Se ha reportado que este catión juega un importante papel en la regulación del $\Delta\psi$ de la membrana plasmática (López *et al.*, 1999) así como del pH interno de la levadura (Calahorra *et al.*, 1998).

En 1935, Lasnitki y Szorényi reportaron que la presencia de iones potasio aceleraba la glucólisis en las levaduras. Posteriormente, Pulver y Verzar (1940) demostraron por vez primera que la entrada de K^+ en las levaduras durante el metabolismo de sustrato externo. Sin embargo, fue hasta los estudios realizados por el grupo de Conway y de Rothstein que se analizó más a fondo el problema. Conway realizó un análisis detallado de los cambios de pH en el exterior y el interior de la levadura durante la fermentación alcohólica (Conway y Downey, 1950; Conway y Brady, 1950). Posteriormente, este mismo investigador sugirió, por vez primera, la existencia de un transporte mediado por un acarreador (Conway y Kernan, 1955). Estos investigadores suponían que un acarreador conectado al metabolismo de la célula generaba protones por medio de acarreadores redox. A continuación, estos protones serían expulsados por dicho sistema para ser intercambiados por el K^+ (Conway y Kernan, 1955; Conway y Duggan, 1958). Sin embargo, la mayor parte de las evidencias que fundamentaban este esquema eran indirectas. Estas se basaban de observaciones acerca del efecto de colorantes redox sobre el transporte de K^+ y el potencial redox de las células. Por su parte, Rothstein describió el efecto del pH del medio y de la concentración externa de K^+ sobre la toma y la liberación de este catión en la levadura (Rothstein y Demis, 1953; Rothstein y Bruce, 1958). Además, propuso la existencia de un acarreador en levadura capaz de transportar K^+ y H^+ y que seguía una cinética de Michaelis-Menten.

Peña y colaboradores (Peña *et al.*, 1967, 1969, 1972; Peña, 1975) estudiaron más a fondo el problema. De acuerdo con sus estudios, tres eran las razones por las que el K^+ podría modificar el metabolismo de la levadura: a) estimulación de la actividad de una o varias enzimas con K^+ ; b) incremento de la velocidad del metabolismo debido a la energía requerida para la

INTRODUCCIÓN

toma del K^+ , c) alteración del metabolismo en virtud de los efectos secundarios resultantes de la entrada del K^+ , por ejemplo el incremento del pH.

Los estudios demostraron que la adición de K^+ a las levaduras durante la fermentación de glucosa y a pH 4.0 externo, provocaba la disminución en los niveles de ATP acompañado por un incremento en ADP y Pi (Peña *et al.*, 1969). Estos experimentos sugirieron que el K^+ estimulaba la actividad de una ATPasa. Además, la disminución de ATP también explicaría la estimulación de la glucólisis y la respiración por el K^+ en las levaduras (Peña *et al.*, 1967). También se midieron los niveles de NADH. Si el sistema de transporte del K^+ dependiera del estado redox de la levadura, los niveles de acarreador reducido disminuiría tras la adición de dicho catión al medio externo. Sin embargo, los experimentos con glucosa mostraron que el K^+ no solamente no disminuía los niveles de NADH, sino que provocaba un incremento del mismo (Peña *et al.*, 1967). Estos datos apuntaban más hacia la existencia de una ATPasa como “enlace” entre el metabolismo y el transporte que un sistema redox.

Por otra parte, Peña *et al.* (1972) encontró que tanto la adición de K^+ como el incremento en el pH del medio provocaban un incremento en la expulsión de protones por la levadura. Estos datos también sugerían la existencia de una bomba de protones y que ésta podía funcionar de manera independiente al transporte de K^+ (Peña *et al.*, 1972), lo cual fue un modelo diferente al propuesto por Conway (Conway y Duggan, 1958). Estudios con inhibidores mostraron que las alquilguanidinas inhibían el transporte de K^+ pero no producían cambio en el bombeo de protones, confirmando la independencia de ambos sistemas (Peña *et al.*, 1973). De esta serie de trabajos se propuso que la bomba de protones en la membrana plasmática de la levadura podría concebirse como el principal translocador primario. Este sería el responsable de la creación del potencial electroquímico necesario para la toma de muchos otros iones a través de la acción de antiportadores, simportadores, etc., similares a los que Mitchell ya había descrito (Mitchel y Boyle, 1967). Posteriormente, Borst-Pauwels (1981) estudió la cinética del transporte de este catión, así como algunas características de la H^+ -ATPasa plasmática.

La H^+ -ATPasa plasmática constituye un componente fundamental de la membrana plasmática de la levadura (Fig. B). El gene que codifica para esta proteína (*PM1*) fue clonado por Serrano *et al.*, (1986). Esta enzima es una de las proteínas más abundantes en la superficie celular; comprende entre el 10 y 20 % del total de las proteínas. Presenta 10 cruces

INTRODUCCIÓN

transmembranales y está altamente conservada en las plantas y hongos, además de que pertenece a la misma familia de las P-ATPasas de mamíferos ($\text{Na}^+\text{-K}^+\text{,H}^+\text{-K}^+$ y $\text{Ca}^{2+}\text{-ATPasas}$). Pma1p es el generador del potencial de membrana plasmática más importante de la levadura. Esta enzima bombea protones al exterior de la célula, por lo que juega un papel esencial en la regulación del pH intracelular así como en la generación del gradiente de protones, el cual hace posible el transporte de muchos nutrientes al interior de la levadura (Vallejo y Serrano, 1989). La fosforilación de Pma1p por Ptk2p estimula su actividad (Erez y Kahana, 2001; Goosens *et al.*, 2000), mientras que su fosforilación por Yck1p y Yck2p reprime su actividad (Estrada *et al.*, 1996).

Por otro lado, Trk1p y Trk2p (Fig. B) constituyen el sistema de entrada de potasio más importante de la membrana plasmática y consumen el potencial de membrana (Serrano, 1991). Se cree que la disipación del potencial de membrana provocado por dichos transportadores regula la actividad de transportadores secundarios (Madrid *et al.*, 1998). Rodríguez-Navarro y Ramos (1984), reportaron la existencia de dos componentes, uno de alta afinidad por el ion potasio ($K_m = 100 \mu\text{M}$) y otro de baja afinidad ($K_m = 50 \text{mM}$). Posteriormente Gaber *et al.* (1988) logró clonar el gene del transportador de alta afinidad (*TRK1*). Posteriormente se demostró que se trataba en realidad de dos transportadores (Trk1p y Trk2p) de la cuales Trk2p es de baja afinidad (Ko y Gaber, 1991). Ambas proteínas muestran una alta homología en su secuencia (55%) y las levaduras mutantes Δtrk1 son viables, pero pierden la alta afinidad por el K^+ . Por otra parte, *TRK1* se expresa en mayor proporción que *TRK2*. Las cinasas Hal4p y Hal5p son reguladores positivos de Trk1p y Trk2p (Mulet *et al.*, 1999), cuya actividad es negativamente regulada por la fosfatasa Ppz1p (Yenush *et al.*, 2002).

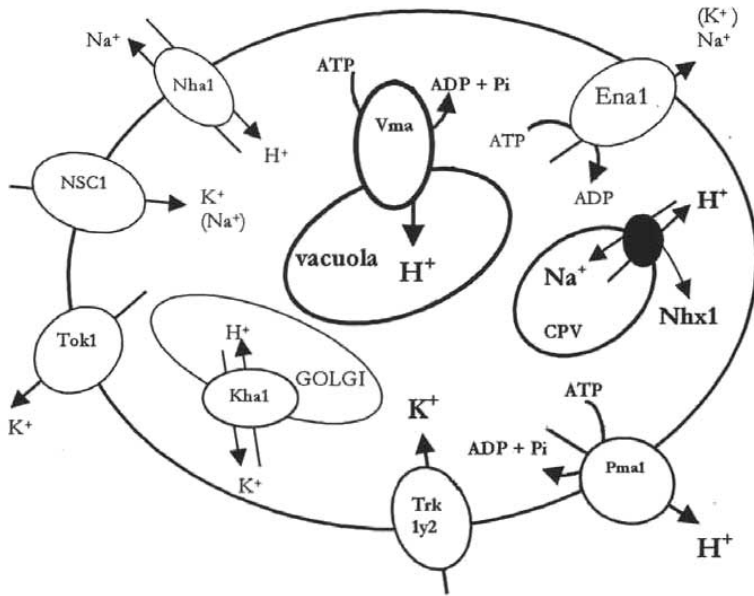


Figura B. Mecanismos de transporte de K^+/Na^+ en *S. cerevisiae*. Los transportadores Trk1/2p llevan a cabo el transporte del ion potasio al interior de la levadura (Rodríguez-Navarro y Ramos, 1984). Tok1p es un canal de rectificación saliente (Ketchum *et al.*, 1995) y Kha1p presenta las características de un antiportador K^+/H^+ (Ramírez *et al.*, 1996; Maresova y Sychrova, 2005). La salida de Na^+ se lleva a cabo a través de la Na^+ -ATPasa Pmr2AP/Ena1p (Garcíadeblas *et al.*, 1993) y del antiportador Na^+/H^+ Nha1p el cual es un antiportador catión/ H^+ (Bañuelos *et al.*, 1998). NCS1p es un canal para cationes, no selectivo, y que no ha sido identificado genéticamente (Bihler *et al.*, 2002). La captura de Na^+ en los compartimentos prevacuolares se lleva a cabo por el antiportador Na^+/H^+ Nhx1p (Nass y Rao, 1998). La membrana vacuolar y prevacuolar es energizada por la H^+ -ATPasa vacuolar (Vma) (Uchida *et al.*, 1998) y la membrana plasmática por la H^+ -ATPasa Pma1p (Serrano *et al.*, 1986).

También se ha demostrado la existencia de un sistema de transporte K^+/H^+ en *S. cerevisiae* (Camarasa *et al.*, 1996; Ramírez *et al.*, 1996) (Fig. B). El gene *KHA1* ha sido identificado en el marco de lectura abierta YJL094c (Ramírez *et al.*, 1998). Por su parte, Kha1p es una

proteína de 97 kDa con 12 cruces transmembranales. Esta proteína presenta muy baja expresión con 0.3 copias de RNAm (Jansen y Gerstein, 2000) y 172 moléculas de proteína por célula (Ghaemmaghami *et al.*, 2003). Los primeros estudios sugirieron que Kha1p mediaba la salida de K^+ de la levadura a través de la membrana plasmática (Ramírez *et al.*, 1998). Sin embargo, estudios más recientes (Maresova y Sychrova, 2005) reportan que Kha1p podría encontrarse en compartimentos intracelulares, de manera similar al antiportador Nhx1p (Nass y Rao, 1997). Estudios de fluorescencia indican que esta proteína se localiza en el aparato de Golgi (Huh *et al.*, 2003). El principal papel de este antiportador sería la regulación iónica y el control del pH en dicho organelo.

Dos corrientes de entrada de K^+ diferentes a Trk1/2p fueron identificados en *S. cerevisiae* por *patch-clamp* (Fig. B). El primero es mediado por Tok1p (Ketchum *et al.*, 1995). Este canal funciona como rectificador de salida de K^+ . El canal funciona permitiendo la salida de iones, pero es capaz de captar K^+ bajo ciertas condiciones (Fairman *et al.*, 1999). El segundo es un sistema de captación de K^+ de baja afinidad denominado *non-specific cation channel 1* (NSC1) (Bihler *et al.*, 1998). La corriente de NSC1 se inhibe por cationes divalentes y es independiente de Trk1p, Trk2p y Tok1p (Bihler *et al.*, 1998). Se ha demostrado recientemente que NSC1p es el componente más importante para la captación de K^+ con baja afinidad en la levadura (Bihler *et al.*, 2002). Sin embargo, a pesar de que se ha realizado un análisis del genoma de la levadura, no se conocen genes candidatos que codifiquen para dicho canal catiónico (Erez y Kahana, 2002). Este canal conduce altas corrientes y es bloqueado por cationes divalentes.

Con respecto al antiportador de Na^+/H^+ Nha1p, esta proteína de 12 segmentos transmembranales, está codificada por el gene *NHA1* (Bañuelos *et al.*, 1998) (Fig. B) Se ha sugerido que Nha1p juega un doble papel dependiendo del pH externo. A pH ácido, esta proteína participa en la regulación de las concentraciones internas de cationes así como en la eliminación de Na^+ o K^+ en exceso. A pH alcalino, condición en la que Ena1p-ATPasa es la principal encargada de eliminar iones Na^+ , Nha1p puede contribuir al amortiguamiento del pH citosólico usando el gradiente de entrada del Na^+ y el K^+ (Sychrova *et al.*, 1999).

La salida de Na^+ es mediada principalmente por la Na^+ -ATPasa Pmr2AP/Ena1p, codificada por el locus *PMR2/ENA* (Garcíadeblas *et al.*, 1993) (Fig. B). Este locus contiene al

menos cinco genes arreglados en *tandem* (*ENA1-5*). De estos, *ENA1* es el que presenta la regulación transcripcional más importante, mientras que *ENA2*, *ENA3* y *ENA4* parecieran ser constitutivamente expresados a muy bajo nivel. El locus *ENA5* se encuentra aún bajo estudio. La expresión de *ENA1* se induce fuertemente por estrés con Na^+ y Li^+ , así como por condiciones alcalinas (Garcíadeblas *et al.*, 1993) y *Ena1p* es considerado como el mecanismo principal para la eliminación de Na^+ y la halotolerancia a Na^+ en *S. cerevisiae*. Además, a últimas fechas se ha dilucidado el mecanismo por el cual tanto *Nha1p* como *Ena1p* se activan durante el estrés osmótico de la levadura (Proft y Struhl, 2004).

Con el fin de obtener un esquema más claro acerca de la dinámica del K^+ , el papel de los diferentes transportadores del K^+ en la levadura se encuentra aún bajo estudio (Yenush *et al.*, 2002; Wadskog y Adler, 2003). Sin embargo, en vista de que el objetivo del presente trabajo se enfoca primordialmente al estudio del transporte del K^+ en la vacuola, el énfasis más importante se dará a la descripción de la vacuola, su membrana y los transportadores vacuolares, más que a los transportadores presentes en la membrana plasmática de la levadura y en otros organelos distintos a la vacuola.

1.5. LA VACUOLA: ESTRUCTURA Y FUNCIÓN

Dados su enorme tamaño y capacidad de almacenamiento, la vacuola juega un papel fundamental en la homeostasis iónica de la levadura. La membrana vacuolar presenta una H^+ -ATPasa responsable del $\Delta\mu_{\text{H}^+}$ (Uchida *et al.*, 1988; Powell *et al.*, 2000). Una gran variedad de iones, aminoácidos y otros nutrientes son transportados al interior de este organelo gracias al ΔpH y/o al $\Delta\psi$ existente en la membrana vacuolar. Acoplada a su función, se encuentran múltiples transportadores secundarios que hacen posible el transporte de una gran cantidad de nutrientes, entre los que destacan iones como el Ca^{2+} (Ohsumi y Anraku, 1983; Halachmi y Eilam, 1996) y aminoácidos (Sato *et al.*, 1984). El K^+ es uno de los cationes que se encuentra en mayor concentración en este compartimento (Klionsky *et al.*, 1990; Okorokov *et al.*, 1980). Se ha descrito la existencia de un canal inespecífico de cationes, capaz de transportar K^+ y otros cationes (Wada *et al.*, 1987). Además, a últimas fechas ha aumentado el estudio de *Nhx1p*, un antiportador Na^+/H^+ presente en los compartimentos prevacuolares (Nass y Rao, 1998). En

secciones posteriores se abundará más acerca de la estructura y función de la V-ATPasa y del antiportador Nhx1p

La vacuola de *S. cerevisiae* juega un papel central en la fisiología de este organismo. Contiene enzimas hidrolíticas, almacena una gran variedad de iones y fue considerada por Matile (1978) como el lisosoma de la levadura. La compartimentalización de ciertas enzimas importantes para el recambio macromolecular (*e.g.* ribonucleasas, proteinasas, polifosfatasas) fue confirmado por Wiemken *et al.* (1979). Más tarde se encontró que las vacuolas no son únicamente un almacén de enzimas proteolíticas en la levadura (Ernter y Wolf, 1984). El análisis de vacuolas aisladas mostró que contiene altas concentraciones de aminoácidos, especialmente aminoácidos básicos (Wiemken y Dürr, 1974; Huber-Wälchli y Wiemken, 1979). Además, se ha encontrado 5 veces más *S*-adenosilmetionina en la vacuola que en el citoplasma (calculado en $\mu\text{mol/g}$ levadura) (Schelenk *et al.*, 1970). También contiene altas concentraciones de Mg^+ y K^+ (Roomans y Seveus, 1976).

Algunas de las funciones más importantes de la vacuola son la regulación del pH, la degradación de proteínas y el almacenamiento de aminoácidos, pequeños iones y polifosfatos, así como la osmoregulación. Su importancia en la homeostasis reside en que le permite a la célula adaptarse a cambios nutricionales a corto y largo plazo. La adaptación a corto plazo parece estar mediada por la liberación y/o intercambio de los nutrientes acumulados en la vacuola. La adaptación a largo plazo parece requerir sus enzimas hidrolíticas. Además, la vacuola se encuentra en íntima relación con el retículo endoplásmico y el aparato de Golgi, los cuales conforman el aparato endocítico y las vesículas de secreción. Estos organelos pueden definirse como parte de un sistema endomembranoso muy plástico y hábil para adaptarse a una variedad de condiciones fisiológicas (Schwencke, 1991).

1.5.1. La membrana vacuolar

La membrana vacuolar o tonoplasto representa el límite entre el contenido vacuolar y el espacio citosólico. Los estudios de microscopía electrónica han demostrado que el tonoplasto es una unidad de membrana típica. Las variaciones en el número y tipo de las partículas durante

el hinchamiento y encogimiento de la vacuola sugieren que se comporta como un “mosaico fluido” (Singer y Nicolson, 1972). A pesar de que muestra amplias similitudes con la membrana plasmática también presenta diferencias. Contrario a la membrana plasmática, la cual es considerada no-elástica, la membrana vacuolar parece serlo en alto grado. La membrana vacuolar presenta una alta capacidad de hinchamiento bajo condiciones hipo-osmóticas (Matile, 1978). Lo anterior es debido probablemente, a las diferencias de composición química del tonoplasto con respecto al plasmalema. De hecho, la membrana vacuolar contiene una alta proporción de residuos de ácidos grasos insaturados, una alta proporción de fosfolípidos, un bajo contenido de lisolecitina, ausencia de ácido fosfatídico y muy baja cantidad de esteroides (Kramer *et al.*, 1978).

Como ya se ha mencionado anteriormente, la sensibilidad de las membranas biológicas a la nistatina y otros antibióticos poliénicos se ha correlacionado sobretodo con la presencia de esteroides y en especial de ergosterol, el cual presenta una mayor afinidad por la nistatina que el colesterol (De Kruijff *et al.*, 1974; Fournier *et al.*, 1998). De acuerdo con lo anterior, la membrana plasmática de la levadura, la cual se encuentra prácticamente libre de colesterol pero que es rica en ergosterol y zimosterol, es extremadamente sensible a la nistatina (Lampen *et al.*, 1962; De Kruijff y Demel, 1974).

En contraste con la membrana plasmática, la membrana vacuolar es resistente a la nistatina (Schwencke y de Robichon-Szulmajster, 1976), lo cual puede explicarse por la baja proporción de ergosterol. Además, el tonoplasto es 10 veces más resistente a moléculas policationicas tales como el citocromo c (Svihla *et al.*, 1969), la polilisina y el DEAE-dextrán (Dürr *et al.*, 1975), en comparación con la membrana plasmática. Esta propiedad ha permitido el diseño de técnicas para la determinación de las pozas citosólica y vacuolar de *S*-adenosil-metionina y aminoácidos, usando células permeabilizadas (Schlenk *et al.*, 1970; Wiemken y Nurse, 1973; Huber-Wälchli y Wiemken, 1979). La mayor resistencia del tonoplasto a las policationes sugiere que, a diferencia de la membrana plasmática, podría tener una menor cantidad de residuos aniónicos expuestos en un área similar al de la cara externa de la membrana plasmática. Sin embargo, otra posibilidad puede ser un menor contenido proteico en el tonoplasto.

También existen diferencias en cuanto a las condiciones estabilizadoras (pH, osmolaridad, sales) utilizadas para el tonoplasto y la membrana plasmática. La vacuola es muy sensible a pH ácido (menor a 6.5), alta concentración de KCl y a bajas concentraciones de iones Mg^{2+} (<5 mM) o Ca^{2+} , pero es estable en condiciones ligeramente alcalinas (pH 7.5-8.0). Por otra parte, los esferoplastos son estables en condiciones ácidas, toleran concentraciones de 0.6 M (o más) de KCl y Mg^{2+} o Ca^{2+} pero son inestables a pH ligeramente alcalino. Las vacuolas pueden conservarse en ATP- Na_2^+ 5 mM, glucosa 50 mM, trietanolamina 25 mM, sorbitol 0.7 M (pH 7.4), sin embargo, esta mezcla provoca una rápida lisis de los esferoplastos (Schwencke y de Robichon-Szulmajster, 1976).

1.5.2. En enzimas asociadas a tonoplasto

La mayor parte de la actividad de α -manosidasa en *S. cerevisiae* se asocia con la membrana vacuolar (Schwencke *et al.*, 1983). Su actividad aumenta cerca de ocho veces durante la esporulación por lo que se ha propuesto que puede jugar un papel importante en dicho proceso (Opheim, 1978).

Otra importante enzima asociada al tonoplasto es la H^+ -ATPasa (Mg^{2+}) (Kakinuma *et al.*, 1981). En contraste con la H^+ -ATPasa plasmática, la H^+ -ATPasa vacuolar es insensible a vanadato. A su vez, su resistencia a azida, oligomicina y ADP la diferencia claramente de la enzima mitocondrial. Ensayada bajo las condiciones apropiadas, se utiliza como un marcador del tonoplasto en levaduras, en *Neurospora crassa* (Bowman, 1983) y *Zea mays* (Bowman *et al.*, 1986). Sin embargo, debe considerarse la existencia de una variedad de "ATPasas vacuolares" presentes en compartimentos ácidos en una amplia variedad de células eucariotas (Mellman *et al.*, 1986) antes de decidir usar una H^+ -ATPasa (Mg^{2+}) como marcador de tonoplasto.

Se ha encontrado la X-prolil-dipeptidil-aminopeptidasa termosensible (DPAP-B), inicialmente detectada en la porción insoluble del extracto de levadura, unida principalmente a la membrana vacuolar (Bordallo *et al.*, 1984). Se ha confirmado que esta enzima es una glucoproteína (Roberts *et al.*, 1989).

1.5.3. Enzimas vacuolares degradativas

La vacuola de levadura contiene numerosas hidrolasas, la mayoría de las cuales son típicas del lisosoma. El carácter lisosomal de la vacuola de levadura fue rápidamente reconocido y se ha reportado una gran variedad de fosfatasas vacuolares (Wiemken *et al.*, 1979). En la vacuola también se encuentran la trehalasa y la quitinasa (Elango *et al.*, 1982). Debe tenerse muy en cuenta que el enriquecimiento relativo de una enzima en la vacuola depende de la cepa, las condiciones de cultivo, la fase de crecimiento al cual las células son cosechadas y la pureza de la fracción vacuolar. Aún la técnica utilizada para obtener esferoplastos puede alterar la actividad de ciertas enzimas vacuolares tal como la H^+ -ATPasa vacuolar (Kakinuma *et al.*, 1981). La Tabla I muestra las actividades enzimáticas que han sido asociadas con la vacuola.

TABLA I. Actividades enzimáticas asociadas a la vacuola de *S. cerevisiae*

<i>ENZIMA</i>	<i>Actividad relativa</i> (con respecto a la α -manosidasa)
<i>Hidrolasas intravacuolares</i>	
Proteinasa A (endoproteinasa ácida)	130
Proteinasa B (endoproteinasa neutral, tipo serina)	143.7
Carboxipeptidasa Y (exoproteinasa, tipo serina)	144
Aminopeptidasa I (metaló, exoproteinasa)	202
Endopirofosfatasa	73.7
Exopirofosfatasa	65.8
Ribonucleasa	135
Trehalasa	33.6

Hidrolasas extracelulares localizadas en la vacuola

Fosfatasa ácida	15
Quitinasa	14
Exo- β -(1,3)-glucanasa	27
Invertasa	20.1
<i>p</i> -nitrofenilacetato esterasa	20.5

Hidrolasas asociadas a tonoplasto

ATPasa (Mg^{2+}) insensible a azida de sodio: pH 7.0	41.4
α -Manosidasa	100
X-Prolidipeptidil aminopeptidasa	65
Fosfatasa alcalina (Mg^{2+})	85

Oxidoreductasas probablemente asociadas a tonoplasto

NADH: citocromo-c oxidoreductasa	ND
NADH:diclorofenol-indofenol oxidoreductasa	0.638

La actividad enzimática en cada caso se muestra con respecto a la α -manosidasa (100%). Tomado de: Schwencke (1991). Vacuoles, internal membranous systems and vesicles. In *The Yeast*. Vol. 4, Cap. 8, 2nd edition.

1.5.4. Biogénesis vacuolar: vías de transporte de proteínas a la vacuola

La compartimentalización subcelular constituye una importante característica de las células eucariotas; ésta propicia el orden de las reacciones y evita la mezcla inapropiada de los componentes celulares. Las células han desarrollado mecanismos de aseguran que proteínas específicas sean enviadas a los organelos correspondientes (Bryant y Stevens, 1998).

INTRODUCCIÓN

Ya se ha mencionado que la vacuola se encuentra involucrada en la regulación del pH, la osmo-regulación, la degradación proteica y el almacenamiento de iones y polifosfatos. Para estas funciones, la vacuola requiere de un conjunto de proteínas. Con el objeto de ubicar a la vacuola en la vía de secreción de proteínas, a continuación se mencionan las diversas vías de envío de proteínas a la vacuola las cuales se muestran en la Fig. C.

En *S. cerevisiae* las proteínas son enviadas a la vacuola a través de diversas vías. La descripción detallada de estos mecanismos rebasa los objetivos de la presente investigación, por lo que solamente serán mencionados a continuación.

- i) las proteínas de la vía de secreción, que llegan a la vacuola a través de la vía de la carboxipeptidasa (CPY) o de la fosfatasa alcalina (ALP). El blanco final de estas proteínas es la superficie celular; estas vías son reversibles.
- ii) endocitosis de proteínas provenientes de la membrana plasmática.
- iii) envío de proteínas desde el citosol a la vacuola con fines biosintéticos.
- iv) autofagia (envío de proteínas de citoplasma a vacuola para su degradación).
- v) herencia de material vacuolar a células hijas durante la división.

Estas vías son diferentes entre sí pero, a pesar de que existen genes específicos para cada una, existe una sobreposición de genes entre ellas lo que las relaciona entre sí celular (Fig. C) (Bryant y Stevens, 1998; Bowers *et al.*, 2000).

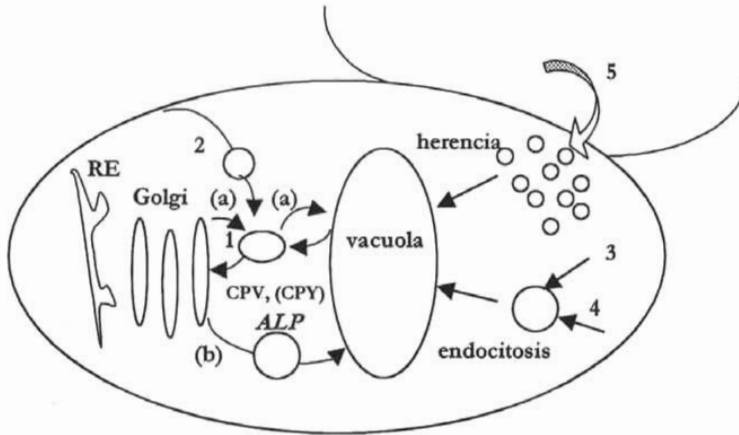


Fig. C. Vías de transporte de proteínas a la vacuola de la levadura. El esquema muestra las vías utilizadas por las proteínas para llegar a la vacuola en *S. cerevisiae*. 1) envío de proteínas del Golgi tardío a la vacuola a) a través de compartimentos prevacuolares (CPV) (vía CPY de la carboxipeptidasa Y) y, b) a través de una ruta alternativa ALP (de la fosfatasa alcalina); 2) endocitosis de proteínas de la superficie celular; 3) envío biosintético del citoplasma a la vacuola; 4) autofagia (envío degradativo de citoplasma a vacuola); 5) herencia vacuolar de células madre a hijas, mediante la fusión homotípica de vesículas vacuolares. Tomado de Bryant y Stevens, (1998) y Bowers *et al.* (2000).

1.5.5. Compartimento prevacuolar

Vida *et al.* (1993) fueron los primeros en describir compartimentos prevacuolares (CPV), que funcionan en el transporte entre el aparato de Golgi y la vacuola. Los estudios que han ayudado al descubrimiento de los componentes de estas vías de tránsito incluyen a la carboxipeptidasa Y (CPY), así como mutantes capaces de acumular gran cantidad de CPY. El envío de proteínas desde el CPV a la vacuola todavía es un enigma y no está claro si se lleva a cabo a través de vesículas (Bryant y Stevens, 1998). En este compartimento se ha descrito la

presencia del antiportador Nhx1p en *S. cerevisiae* y del cual se tratará más adelante (Nass y Rao, 1998).

1.6. TÉCNICAS DE ESTUDIO DE LA VACUOLA

La vacuola de levaduras y hongos es un organelo voluminoso limitado por la membrana vacuolar o tonoplasto. El principal problema para aislarla es su fragilidad; se rompe inevitablemente con los métodos convencionales de ruptura celular. Se han descrito diversas técnicas para su aislamiento. Además, se han desarrollado otras técnicas como la permeabilización de las levaduras y de otros organismos, así como la preparación de esferoplastos permeables para estudiar *in situ* la vacuola.

1.6.1. Aislamiento de vacuola

Las vacuolas sólo pueden obtenerse mediante la ruptura suave de la membrana plasmática de los esferoplastos, ya sea bajo condiciones hipo-osmóticas en presencia de Ficoll o bajo condiciones iso-osmóticas. Sin embargo, a pesar del buen rendimiento que ofrece la primera técnica, bajo condiciones hipo-osmóticas el tonoplasto se daña y la vacuola pierde capacidad para acumular moléculas pequeñas. Estas desventajas pueden ser superadas por ruptura mecánica de los esferoplastos bajo condiciones iso-osmóticas (Wiemken y Dürr, 1974), o por la permeabilización con el polímero policationico DEAE- dextran (Dürr *et al.*, 1975). Esta técnica favorece la obtención de vacuolas que mantienen las moléculas de bajo peso molecular y las macromoléculas en virtud del mínimo daño provocado en el tonoplasto. Por esta razón el aislamiento de vacuolas bajo condiciones iso-osmóticas ha sido utilizado para experimentos fisiológicos, tales como el estudio del transporte de metabolitos de bajo peso molecular. Variaciones de esta técnica han permitido dar seguimiento al transporte a través de vesículas vacuolares (Ohsumi y Anraku, 1981; Sato *et al.*, 1984). Sin embargo, algunas alteraciones pueden observarse en vacuolas obtenidas de esferoplastos tratados con β -mercaptoetanol. La principal alteración es la disminución de su capacidad de transporte de arginina en comparación con las

vacuolas obtenidas en ausencia de agentes sulfhidrilo y en presencia de iones Mg^{2+} . A partir de las vacuolas se pueden preparar vesículas vacuolares y aislarlas por centrifugación diferencial (Ohsumi y Anraku, 1981; Sato *et al.*, 1984).

1.6.2. Levaduras permeables

Los estudios *in situ* en levaduras como *Kluyveromyces fragilis* y *Ashbya gossypii* (Joshi *et al.*, 1987; Förster *et al.*, 1998) así como en hongos filamentosos como *N. crassa* (Keenan y Weiss, 1997) se han realizado con diversos fines. Se ha utilizado una gran variedad de detergentes entre los que destacan: la digitonina, el CTAB, el pluronic-F68 y el Brij 58, utilizados principalmente para la permeabilización de la membrana plasmática (Gowda *et al.*, 1988; Laouar *et al.*, 1992). En muchos casos, las células permeabilizadas se utilizan como fuente enzimática y se aplican a diversas técnicas de degradación y en algunos casos con fines biotecnológicos como para la producción de leche sin lactosa (Joshi *et al.*, 1987).

Sin embargo, las células permeabilizadas también han sido utilizadas en el estudio de organelos internos tales como la mitocondria (Manon y Guérin, 1997; Noubhani *et al.*, 2002) y la vacuola. Existen diversos agentes permeabilizantes que han tenido cierto éxito en los estudios de transporte vacuolar tanto en levaduras como en hongos filamentosos. Algunos ejemplos lo constituyen: la digitonina (Förster *et al.*, 1998), el DEAE-dextrán (Huber-Wälchi y Wiemken, 1979) y el $CuCl_2$ (Ohsumi *et al.*, 1988; Keenan y Weiss, 1997; Nass y Rao, 1998).

Aparentemente, la técnica que ha sido aplicada con mayor éxito al estudio del transporte vacuolar es la desarrollada por Ohsumi *et al.* (1988), que utiliza $CuCl_2$ como agente permeabilizante, principalmente en el estudio del contenido vacuolar, ya sea de aminoácidos en *N. crassa* (Keenan y Weiss, 1997) o del Na^+ en *S. cerevisiae* (Nass y Rao, 1997).

1.6.3 Esferoplastos permeables

Los esferoplastos permeables han sido utilizados en gran medida por grupos de investigación interesados en la fisiología mitocondrial. Los estudios *in situ* evitan la manipulación de los organelos, lo cual ayuda a mantener sus funciones. Pero además, en ciertos casos ha sido

posible estudiar relaciones metabólicas de los componentes citosólicos y mitocondriales, con una visión más completa del funcionamiento de la célula (Avéret *et al.*, 1998). Esta técnica consiste en la aplicación de esferoplastos permeabilizados con nistatina al estudio *in situ* de la mitocondria en *S. cerevisiae*.

Los primeros estudios con esferoplastos de levaduras se remontan a la década de los 50 (Eddy y Williamson, 1959). Desde aquella época, ha tenido múltiples aplicaciones. Destacan el análisis de los residuos de la pared celular liberados durante la producción de esferoplastos y el estudio del metabolismo *in situ* de distintos organelos o vías metabólicas (Pardo *et al.*, 1999; Avéret *et al.*, 1998; Milani *et al.*, 2001). Se denomina esferoplasto a la célula a la que se le ha removido la mayor parte de la pared celular y se le denomina protoplasto cuando la totalidad de la pared celular ha sido removida (Hutchison y Hartwell, 1967). La preparación de los esferoplastos consiste en la remoción enzimática de la pared celular mediante enzimas como la glucosilasa (Wolska-Mitaszko *et al.*, 1981), liticasa (Milani *et al.*, 2001) y zimoliasa (Avéret *et al.*, 1998), como las más utilizadas. Su forma de acción consiste en la degradación de los enlaces β -glucano. Para comprender a nivel molecular la forma de acción de estas enzimas es necesario saber un poco más acerca de la naturaleza de la pared celular en las levaduras.

1.7. LA PARED CELULAR DE LAS LEVADURAS

La pared celular de las levaduras es una estructura rígida que confiere protección mecánica, establece la forma celular y evita el paso de macromoléculas. Sin esta barrera, la célula está desprotegida de los cambios del medio ambiente y se lisaría debido a cambios en la presión osmótica del medio exterior. La pared celular de *S. cerevisiae* está compuesta de aproximadamente un 20% de su peso seco de β -glucanos y manoproteínas, así como de pequeñas cantidades de quitina y lípidos (Fleet, 1991). Los principales grupos de polisacáridos que forman la pared celular son polímeros de manosa unidos covalentemente a péptidos (manoproteínas, ~40%), polímeros de glucosa (β -glucanos, ~60%) y polímeros de *N*-acetilglucosamina (quitina, ~2%). El esqueleto de la pared celular está conformado principalmente por β -1,3-glucanos, que son los más abundantes de los β -glucanos y están unidos covalentemente a la quitina (Kollar *et al.*,

1995) y a β -1,6-glucanos (Kollar *et al.*, 1997; Klis *et al.*, 2002) y es el responsable de la forma y rigidez de la pared celular (Hartland *et al.*, 1994). El β -1,6-glucano contiene predominantemente uniones β -1,6 con un promedio de 140 residuos de glucosa y con algunos puntos de ramificación β -1,3 que confieren estabilidad a la pared celular. Además, el β -1,6-glucano tiene un papel preponderante en la arquitectura de la pared celular, ya que a éste se anclan la mayor parte de las manoproteínas y también está unido a los β -1,3-glucanos y a la quitina (Magnelli *et al.*, 2002). El β -1,3-glucano consiste principalmente en uniones β -1,3-glucano con un promedio de 1500 residuos de glucosa y con algunos puntos de ramificación a través de uniones β -1,6. Por otra parte, la capa externa de la pared celular consiste en manoproteínas que protegen a la célula de enzimas externas y funcionan como barrera para retener a las proteínas periplásmicas (De Nobel *et al.*, 1990).

Por el tipo de unión que presentan con la pared celular, las manoproteínas se clasifican en dos. La primera subclase está compuesta por proteínas que pueden ser extraídas con SDS y agentes reductores (-SH). Estas proteínas están unidas de forma no covalente o puentes disulfuro (-S-S-) a la pared celular y se denominan proteínas solubles de pared celular (Scwp) (Cappellaro *et al.*, 1994). La otra clase son proteínas unidas covalentemente al esqueleto de glucanos. Estas proteínas covalentemente unidas (Ccwps) se agrupan en dos subclases dependiendo de su unión al glucano. Las proteínas PIR-Ccwps (proteínas con repeticiones internas) se unen directamente al β -1,3-glucano a través de una unión aún no identificada y pueden ser liberadas de la pared celular por β -1,3-glucanasa o por extracción alcalina (Klis *et al.*, 2002).

La segunda subclase está formada por las proteínas glicosilfosfatidilinositol (GPI)-Ccwps, las cuales están unidas al β -1,6-glucano a través de una forma procesada del "ancla" GPI (Kollar *et al.*, 1997). En el paso de transferencia de la membrana plasmática a la pared celular, el ancla GPI se corta, los grupos glucosaminil y fosfatidilinositol se pierden y se postula que la proteína se une al β -1,6-glucano a través de un residuo que contiene fosfoetanolamina y varios residuos de manosil (Kollar *et al.*, 1997). Debido a que el β -1,6-glucano está unido al β -1,3-glucano, las proteínas GPI-Ccwps pueden ser extraídas de la pared celular con β -1,3-glucanasas

y β -1,6-glucanasas. Las proteínas GPI-Ccwps están involucradas en la hidrofobicidad de la superficie celular y en la resistencia a enzimas líticas en las células de fase estacionaria.

A pesar de su aparente rigidez, la pared celular es una estructura muy dinámica, susceptible de muchas modificaciones que ocurren en diferentes estados del ciclo de vida de la célula. Todos los cambios en la pared celular deben estar regulados por: a) el balance entre los procesos de síntesis y de degradación de los componentes estructurales de la pared celular y, b) por la secreción dirigida de enzimas y componentes de la pared celular a los sitios en donde ocurre el crecimiento (Packeiser *et al.*, 1999). Además, los procesos involucrados en la síntesis de la pared celular responden a diferentes señales del medio ambiente tales como niveles de nutrientes, feromonas, concentración de sales y temperatura. Al menos para la regulación de la biosíntesis del β -1,3-glucano, se observó que está bajo control de la vía mediada por la proteína cinasa C (PKC), la cual es estimulada por diversas condiciones que afectan el tamaño y la forma de la célula (Shimizu *et al.*, 1994).

1.8. LAS V-ATPasas, ESTRUCTURA Y FUNCIÓN

Las ATPasas vacuolares translocadoras de protones (V-ATPasas) forman una familia de bombas de protones que acoplan la hidrólisis del ATP al movimiento de protones a través de la membrana. La eliminación de la función de la V-ATPasa es letal en todos los organismos eucariotes probados a la fecha, excepto en *S. cerevisiae*. Lo anterior convierte a *S. cerevisiae* en un organismo ideal para el estudio de la estructura, función y ensamble de este complejo enzimático (Nishi y Forgac, 2002). En las levaduras, la V-ATPasa está principalmente en la membrana vacuolar, aunque una pequeña población está en los compartimentos tardíos del aparato de Golgi así como en los endosomas, siendo también importante en la acidificación de estos organelos (Graham *et al.*, 2003).

Este movimiento de protones acidifica los compartimentos intracelulares, lo cual es crítico para procesos celulares tales como: la endocitosis mediada por receptor, el procesamiento y la degradación de macromoléculas, el tráfico intracelular de enzimas lisosomales, el transporte acoplado de pequeñas moléculas y la entrada de ciertos virus con membrana (Nishi y Forgac,

2002). En ciertas células especializadas tales como las células intercaladas de riñón, osteoclastos, macrófagos y las células *goblet* de insectos, las V-ATPasas están presentes en la membrana plasmática y funcionan en procesos tales como la acidificación renal, la reabsorción de hueso, la homeostasis del pH y el transporte acoplado de potasio (Brown y Breton, 2000; Li *et al.*, 1999; Nanda *et al.*, 1996; Wieczorek *et al.*, 2000).

Tabla II. Propiedades de algunas ATPasas en *S. cerevisiae*

	ATPasa		
	Vacuolar	Mitocondrial	Membrana plasmática
pH óptimo	7.0	9.5	5.6
Km para ATP (mM)	0.2	0.3	0.1

Efecto de inhibidores

Inhibidor (mM)	Actividad (%)		
Ninguno	100	100	100
Vanadato (0.05)	98	101	11
Diciclohexilcarbodiimida (0.1)	21	27	98
Oligomicina (0.1)	65	18	15
Azida (0.5)	102	23	90
Bafilomicina* (1 nM)	5	100	100
Concanamicina* (1 nM)	6	100	100

Tomado y actualizado de Schwencke (1991). *Bowman *et al.* (2004).

La V-ATPasa de vacuola en *S. cerevisiae* fue primeramente descrita por Kakinuma *et al.* (1981) y Okorokov *et al.* (1982). La V-ATPasa vacuolar presenta claras diferencias con la ATPasas mitocondrial y plasmática (Tabla II). Esta enzima genera una diferencia de potencial electroquímico de protones de 180 mV, una diferencia de 1.7 unidades de pH en el interior ácido de la vacuola y un potencial de membrana de 75 mV a través del tonoplasto, presentando su sitio catalítico hacia el citoplasma. Es fuertemente inhibida por la bafilomicina y concamicina (Bowman *et al.*, 2004), y en menor proporción por la N, N'-dicitclohexil-carbodiimida (DCCD); pero es insensible a oligomicina, azida de sodio, vanadato de sodio o miconazol.

1.9. TRANSPORTADORES VACUOLARES

La diferencia de potencial electroquímico generado por la V-ATPasa es utilizado para el transporte de aminoácidos e iones al interior de la vacuola (Forgac, 1999; Shao y Forgac, 2004). En el caso de *S. cerevisiae*, la V-ATPasa es la única generadora de energía electroquímica a través de la membrana vacuolar, a diferencia de otros sistemas, como los vegetales, cuya vacuola también contiene una pirofosfatasa (Shimaoka *et al.*, 2004). El gradiente de protones es la fuerza primaria que hace posible el transporte de la mayoría de los metabolitos. Los protonóforos como el CCCP, PCF y SF6847 así como el ionóforo nigericina, bloquean tales mecanismos de transporte. Se ha descrito el transporte de cationes como Ca^{2+} (Ohsumi y Anraku, 1983; Halachmi y Eilam, 1996; Pittman *et al.*, 2004), PO_4^{3-} (Booth y Guidotti, 1997), Cd^{2+} (Eraso *et al.*, 2004), Zn^{2+} (MacDiarmid *et al.*, 2000), Mg^{2+} (Okorokov *et al.*, 1980) y de aminoácidos (Rusnak *et al.*, 2001; Shimazu *et al.*, 2005).

Se han identificado ocho transportadores independientes en vesículas vacuolares de *S. cerevisiae* (Sato *et al.*, 1984; Rusnak *et al.*, 2001; Shimazu *et al.*, 2005). Existen antiportadores aminoácido/ H^+ para arginina, arginina-lisina, histidina, fenilalanina-triptofano, tirosina, glutamina-asparagina e isoleucina-leucina, además de otro antiportador arginina-histidina que utiliza el potencial químico del gradiente de concentración de la histidina. Es importante hacer notar la existencia de tres transportadores para arginina, el aminoácido más rico en nitrógeno, lo que indica la importancia de la vacuola como reserva de nitrógeno. Los aminoácidos acumulados en la vacuola se encuentran a niveles de 5-40 veces por arriba de los correspondientes en el

citósol. Se ha observado que la poza citosólica es constante, pero la vacuolar varía ampliamente, dependiendo de los nutrientes disponibles y de las condiciones de cultivo (Huber-Wälchli y Wiemken, 1979; Kitamoto *et al.*, 1988).

Con respecto a los iones, es importante que la vacuola regule la concentración citosólica de los mismos por varias razones: i) algunos iones como Sr^{2+} , Co^{2+} y Pb^{2+} son tóxicos en el citósol, ii) los iones útiles incluyendo Ca^{2+} , Mg^{2+} y Zn^{2+} pueden ser peligrosos a altas concentraciones y iii) la concentración de los iones que juegan un papel regulador debe ser estrictamente controlada. Otros iones tales como Fe^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} y PO_4^{3-} también se acumulan en la vacuola (Klionsky *et al.*, 1990; Li *et al.*, 2001; Yang *et al.*, 2005). También se ha descrito un canal de cationes inespecífico a través del cual pueden ser transportados K^+ , Na^+ , Li^+ y otros (Wada *et al.*, 1987). Sin embargo, más recientemente se ha descubierto que dicho canal es el responsable del flujo específico de Ca^{2+} desde la vacuola hacia el citoplasma (Palmer *et al.*, 2001).

1.10. EL ANTIPORTADOR Na^+/H^+ Nhx1p

Nhx1p se encontró en mutantes $\Delta pma1$ resistentes a estrés salino (Nass *et al.*, 1997). Estos investigadores contaban inicialmente con mutantes $\Delta cnb1$ que carecían de calcineurina lo que les provocaba sensibilidad a alta concentración salina. Lo anterior responde a que la calcineurina promueve la tolerancia a Na^+ al incrementar la expresión del gene *PMR2A/ENA1* (Nakamura *et al.*, 1993; Mendoza *et al.*, 1994). Sin embargo, las mutantes $\Delta pma1$, supresoras de las mutantes $\Delta cnb1$, mostraban una mayor habilidad para almacenar Na^+ . Se encontró que el almacenamiento de Na^+ en los compartimentos prevacuolares contribuía a la halotolerancia de la cepa $\Delta pma1$ (Nass y Rao, 1998). Al analizar el efecto de la eliminación de *NHX1* sobre la mutante $\Delta pma1$, se observaba la disminución de la tolerancia a Na^+ . Estos resultados demostraron que la halotolerancia de dicha cepa se encontraba mediada, en gran medida, por el intercambiador Na^+/H^+ , Nhx1p (Nass *et al.*, 1997).

Este antiportador pertenece a la familia NHE de antiportadores Na^+/H^+ , que en los mamíferos se requieren para varias funciones celulares como: la regulación del volumen celular,

INTRODUCCIÓN

el pH intracelular, la reabsorción de sodio a través del riñón, intestino y otras membranas epiteliales (Counillon y Pouyssegur, 2000). Posteriormente, Bowers *et al.* (2000) describieron la participación de Nhx1p como una proteína involucrada en el tráfico de proteínas.

Nhx1p juega un importante papel en el tráfico de proteínas, ya que su ausencia altera el pH endosomal, lo que provoca alteraciones en el envío de proteínas. De hecho, es el primer intercambiador Na^+/H^+ descrito en levaduras que juega un papel importante en el envío correcto de proteínas, por lo que el balance iónico intraorganelar pudiera ser importante para la función endosomal en la levadura (Bowers *et al.*, 2000). En las mutantes $\Delta nhx1$ se ha observado que proteínas membranales de vacuola, del compartimento prevacuolar y de Golgi, las cuales, normalmente siguen la vía CPY, se acumulan en un PVC agrandado. En contraste con lo anterior, el tráfico en la vía ALP no se altera (ver Fig. C).

Nhx1p es una proteína de 633 aminoácidos, con 12 segmentos transmembranales y con ambos extremos, carboxilo y amino, orientados hacia el citosol. Es una proteína que se encuentra glicosilada en el extremo carboxilo (Wells y Rao, 2001) y es a través de este segmento que interactúa con la GTPasa Gyp6 (Ali *et al.*, 2004). Nhx1p está codificado por el gene YDR456w que se localiza en el cromosoma IV de la levadura.

El papel principal de este antiportador radica en la regulación del pH intravesicular de los compartimentos prevacuolares así como en el tráfico de proteínas. Nhx1p compete con la proteína YPT6p por su unión a la GTPasa Gyp6. Cuando esta última proteína interactúa con Nhx1p, inhibe la actividad de este antiportador provocando la acidificación de los CPV; además, se activa la vía anterógrada que lleva proteínas del aparato de Golgi a los CPV y de estos últimos a la vacuola (Fig. C). En cambio, cuando Gyp6p se une a YPT6p, Nhx1p se activa provocando el efecto contrario, es decir, alcaliniza los CPV y estimula la vía retrógrada que lleva proteínas de la vacuola a los CPV y de éste al aparato de Golgi (Ali *et al.*, 2004).

1.11. HIPÓTESIS

Si la adición de K^+ a las levaduras incrementa el pH vacuolar (Calahorra *et al.*, 1998, Martínez, 1999) y diversos transportadores de iones acoplados a protón (antiportadores ión/protón) han sido descritos en la vacuola de la levadura, (Klyonsky, 1980; Ohsumi y Anraku, 1983; Eraso *et al.*, 2004; MacDiarmid *et al.*, 2000) es posible que exista un antiportador K^+/H^+ en la vacuola de *S. cerevisiae*.

1.12. OBJETIVOS DE LA PRESENTE INVESTIGACIÓN

OBJETIVO GENERAL

Llevar a cabo el estudio *in situ* del transporte del K^+ en la vacuola de *S. cerevisiae*.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Preparar esferoplastos permeables tratados con zimoliasa en dos cepas de *S. cerevisiae* (La Azteca y BY4742), y evaluar la permeabilidad de la membrana plasmática y la integridad de los organelos internos (mitocondria y vacuola).
2. Utilizar los esferoplastos permeables para el estudio de la bioenergética vacuolar (ΔpH , $\Delta \psi$), la cuantificación del potasio interno y para la caracterización del mecanismo de transporte del ion potasio a la vacuola.
3. Evaluar el papel del antiportador Na^+/H^+ Nhx1p en el transporte del K^+ en la vacuola de *S. cerevisiae*.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. CEPAS Y CONDICIONES DE CULTIVO

Se precultivaron células de una colonia aislada de la levadura de panadería (La Azteca) en 100 mL de medio YPD (glucosa 2%, extracto de levadura 1% y bactopectona 1%) por 24 h a 30°C. Posteriormente, la suspensión se añadió a 1.0 L del mismo medio, y las células se incubaron 6-8 h a 30°C. Las células se cosecharon y lavaron dos veces con agua destilada por centrifugación. Se resuspendieron en 250 ml de agua destilada y ayunaron por 16 h en aereación a 30°C. La levaduras se colectaron, lavaron y resuspendieron en agua en una proporción de 0.5 g peso húmedo/ml. Las células usadas para medir el pH vacuolar en células intactas (La Azteca, S.A.) se incubaron en 500 ml de YPD durante 24 h a 30 °C y ayunaron de la misma forma antes descrita. Para los experimentos en que se midió la respiración, se precultivaron las levaduras por 24 h a 30°C en 100 ml de un medio compuesto por: extracto de levadura 1%, KH_2PO_4 0.1%, NH_2SO_4 0.12% y lactato de sodio al 2% ajustado a pH 6.6. Al final de esta incubación, las células se resuspendieron en 1.0 L del mismo medio y se incubaron 16-18 h a 30°C. Finalmente, las células se cosecharon, lavaron y ayunaron tal y como se ha descrito anteriormente. Para la cepa BY4742 y la mutante $\Delta nhx1$ (gentilmente donada por la Dra. Rajini Rao), las condiciones de crecimiento fueron las mismas que para La Azteca, excepto que todos los medios incluyeron uracilo 120 mg/L.

2.2. PREPARACIÓN DE ESFEROPLASTOS

Los esferoplastos de ambas cepas se prepararon como reporta Avéret *et al.* (1998) con algunas modificaciones: Se utilizó zimoliásia 20T (ICN) y en vista de que las cepas utilizadas no requirieron nistatina, se omitió el uso de este compuesto. Se lavó 1.0 g de peso húmedo de células dos veces con 20 ml de agua destilada y se incubaron 15 min con agitación suave a 32 °C en 20 ml de un buffer compuesto por β -mercaptoetanol 0.5 M y Tris-HCl 0.1 M, pH 9.3. Al final de esta incubación, las células se lavaron tres veces con una mezcla de

Buffer A: ácido maleico-tris 10 mM, pH 6.8, sorbitol 0.75 M, manitol 0.4 M (ambos desionizados) y BSA 0.1 %. Posteriormente, las células fueron suspendidas en 20 ml de sorbitol 1.35 M, etilen-glicol-bis-(α -aminoetiléter)-N,N,N',N'-tetraacetato (EGTA) 1 mM y fosfato-citrato 10 mM (pH 5.8). Se añadieron 5 mg de zimoliasa y las células se incubaron durante 30 min a 32 °C con agitación suave. Los esferoplastos se centrifugaron a 2500 rpm por 5 min, se lavaron tres veces con Buffer A y se resuspendieron en Buffer B: MES 10 mM ajustado con trietanolamina TEA a pH 6.0, sorbitol 1.35 M y BSA 0.1%. Los esferoplastos se almacenaron a -20 °C. Los esferoplastos preparados de células crecidas en medio con lactato se resuspendieron en un buffer con fosfato de potasio 10 mM, pH 6.8, sorbitol 1 M, NaCl 1.7 mM, MgSO₄ 2 mM, EGTA 0.5 mM y BSA 0.1 %. Inmediatamente antes de cada ensayo, los esferoplastos se aerearon por 30 min a 30 °C en MES-TEA 10 mM pH 6, sorbitol 1.35 M y BSA 0.1 % y fueron utilizados el mismo día de su preparación.

2.3. PREPARACIÓN DE VACUOLAS

Las vacuolas se prepararon de acuerdo con Ohsumi y Anraku (1981) con algunas modificaciones. Se aislaron de 50 g de levaduras crecidas durante 6 h en YPD y ayunadas 16 h. Los esferoplastos se prepararon de acuerdo a la técnica descrita arriba y después del lavado con Buffer A, se lavaron dos veces con YPD-sorbitol 1 M, de acuerdo con Kane (1995). Los esferoplastos se resuspendieron en 10 volúmenes de Buffer C: MES-Tris 10 mM, pH 6.9, MgCl₂ 0.1 mM, Ficoll 12% y homogeneizados en un homogeneizador Dounce. Posteriormente se centrifugaron en un rotor de columpio SW28Ti a 26,600 g durante 30 min. La capa blanca superior de los tubos, que contenía la mayor parte de las vacuolas, se recolectó y resuspendió en Buffer C con el homogeneizador. Posteriormente, 5 ml de estas vacuolas no purificadas se colocaron en la parte superior de tubos de centrífuga conteniendo 5 ml de Buffer D: MES-Tris 10 mM, pH 6.9, 0.5 mM MgCl₂, Ficoll 8%. Los tubos se centrifugaron en un rotor de columpio SW40Ti bajo las condiciones descritas anteriormente. Las vacuolas se recuperaron de la parte superior y se resuspendieron en Buffer B.

2.4. POTENCIAL DE LA MEMBRANA PLASMÁTICA

El potencial de la membrana plasmática de células intactas y de esferoplastos se estimó siguiendo la fluorescencia del DiSC₃(3) (Molecular Probes) (Peña *et al.*, 1984) bajo las condiciones descritas en cada ensayo. El trazo se inició por la adición de 25 mg de peso húmedo de levaduras o 2 mg de proteína de esferoplastos. La incubación se realizó en MES-TEA 10 mM, pH 6.0, sorbitol 1.35 M, CaCl₂ 100 μM, pentaclorofenol 10 μM en presencia o ausencia de glucosa 50 mM. Posteriormente, después de 10 seg, se añadió 250 nM de cianina, seguido de KCl 10 mM a los 500 seg. La fluorescencia se registró a 540-590 nm.

2.5. RESPIRACIÓN

El consumo de oxígeno se midió con un electrodo Clark a 30 °C en una cámara de temperatura controlada, con un sistema de adquisición de datos. Se utilizaron levaduras crecidas en medio de lactato y bajo aereación vigorosa. En el caso de levaduras intactas, se utilizaron 25 mg de peso húmedo de las mismas y se incubaron en HEPES-TEA 10 mM, pH 7 en un volumen final de 5 ml. En el caso de los esferoplastos, éstos se obtuvieron de las mismas levaduras crecidas aeróbicamente en lactato. Se aerearon 2 mg de proteína de esferoplastos durante 30 min a 30 °C y se incubaron en: KH₂PO₄ 10 mM (pH 7.0), sorbitol 1 M, BSA 0.1%, NaCl 1.7 mM, MgSO₄ 2 mM y EGTA 0.5 mM a un volumen final de 5 ml. Cada uno de los substratos se utilizó a una concentración de 10 mM (lactato, glucosa y piruvato ajustados a pH 7.0), excepto el etanol cuya concentración fue 109 mM y 100 μM de ADP. Los ensayos realizados con lactato y etanol incluyeron NAD⁺ 2 mM y cuando la glucosa fue el substrato de los esferoplastos, el medio se complementó con ATP 2 mM, NAD⁺ 2 mM y NH₄Cl 10 mM.

2.6. FLUJO DE NUCLEÓTIDOS EN ESFEROPLASTOS

Se prepararon los esferoplastos y se tomaron alícuotas a distintos tiempos de incubación con zimoliasa; se agitaron brevemente, se centrifugaron y se recuperó el sobrenadante. Las proteínas se precipitaron con ácido tricloroacético al 25% y se midieron los nucleótidos por absorbancia a 260 nm en el sobrenadante desproteinizado.

2.7. FLUJO DE PROTEÍNAS EN LOS ESFEROPLASTOS

Se prepararon los esferoplastos y se tomaron alícuotas a distintos tiempos de incubación con zimoliasa; se agitaron brevemente, se centrifugaron y se recuperó el sobrenadante. Las proteínas se determinaron por absorbancia a 280 nm en el sobrenadante.

2.8. ENSAYO DE GLUCOSA 6-FOSFATO DESHIDROGENASA

Durante la preparación de los esferoplastos, se tomaron alícuotas a distintos tiempos de incubación con zimoliasa; se agitaron brevemente y lavaron tres veces con Buffer B, y se resuspendieron en Buffer A. El ensayo de la glucosa 6-fosfato deshidrogenasa se llevó a cabo de acuerdo con Avéret *et al.* (1998) con ligeras modificaciones. 1 mg de proteína de esferoplastos se preincubó durante 10 min a 25°C en HEPES-TEA 20 mM, pH 7.4 y sorbitol 1 M. A continuación se añadió glucosa 6-fosfato 3 mM y antimicina 20 µg/ml y la reacción se inició con NADP⁺ 0.13 mM. Se siguió la absorbancia a 340 nm durante 5 min a 25°C.

2.9. PRODUCCIÓN DE NADH EN ESFEROPLASTOS Y EN LEVADURAS

Los esferoplastos se prepararon como ya se describió. Se utilizaron 25 mg de peso húmedo de levaduras o 1 mg de proteína de esferoplastos previamente aereados durante 30 min a 30°C. Para ambos casos, el medio de incubación fue MES-TEA 10 mM, pH 6 y sorbitol 1.35 M. Se observó el efecto de glucosa 50 mM y KCl 50 mM y la producción de NADH se siguió por los cambios en la fluorescencia a 340-460 nm.

2.10. CONTENIDO DE POTASIO INTRACELULAR

20 mg de células o la cantidad equivalente de esferoplastos (peso húmedo) provenientes de células tratadas según se indica en casa caso, se diluyeron en 5 ml de MES-TEA 10 mM (pH 6.0). Se lisaron en un baño de agua a ebullición durante 20 min y se centrifugaron. La concentración de K⁺ se midió en una dilución adecuada del sobrenadante con un fotómetro de flama Zeiss PF5.

2.11. ACTIVIDAD DE ATPasa

La actividad de ATPasa se midió en los esferoplastos de acuerdo con Calahorra *et al.* (1987) con algunas modificaciones. El ensayo se realizó con 0.25 mg de proteína en 250 μ l de MES-TEA 10 mM, pH 6.0, $MgCl_2$ 5 mM, ATP-Tris 0.5 mM y molibdato de amonio 1 mM. Donde se indica, se añadió bafilomicina 10 μ M, dietilestilbestrol (DES) 2.5 mM y azida de sodio 2 mM. La reacción se inició con la adición de la proteína y la mezcla se incubó 10 min a 30°C. La reacción se detuvo con la adición de 100 μ l de ácido tricloroacético 30% y los tubos se transfirieron a un baño de hielo. Se centrifugaron, y el fosfato liberado se midió en el sobrenadante por el método de Fiske y Subbarow (1925).

2.12. TRANSPORTE DE K^+ EN ESFEROPLASTOS

Las levaduras crecidas en la fase exponencial en YPD y ayunadas se convirtieron en esferoplastos con zimoliasa (ver Material y Métodos) y se monitoreó el transporte del ion potasio. Se siguió la toma de potasio midiendo la concentración externa con un electrodo selectivo de potasio conectado a un potenciómetro (Beckman Selection 2000) y una computadora. La mezcla contenía: 1 mg de proteína de esferoplastos en MOPS-TEA 1 mM, pH 7.0, sorbitol 1.35 M y BSA 0.1%, además de vanadato de sodio 50 μ M y oligomicina 5 μ g/mg proteína en un volumen final de 5 ml a 30°C. Los trazos se iniciaron después de 10 seg con la adición de los esferoplastos; donde se indica se añadió ATP - Mg^{2+} 5 mM o PCF 10 μ M. En los trazos con bafilomicina A₁, 10 μ M y con el derivado de la amilorida (5-[N,N-hexametilen]-amilorida) 5 μ M, ambos inhibidores fueron añadidos desde el principio del trazo. Los cambios fueron calibrados por adiciones de KCl 10 μ M.

2.13. POTENCIAL DE MEMBRANA VACUOLAR

La generación del potencial de membrana ($\Delta\psi$) en la vacuola fue seguido por el apagamiento de la fluorescencia del oxonol V (Calahorra *et al.*, 1987). Los esferoplastos (1 mg de proteína) se añadieron a la celda del espectrofotómetro conteniendo MES-TEA 10 mM, pH 6.0, sorbitol 1.35 M, $MgSO_4$ 5 mM, 50 μ M de vanadato de sodio y oligomicina 5 μ g/mg proteína. Para dar seguimiento al potencial de membrana positivo del interior de la

vacuola generado por el ATP, se añadió oxonol V $2 \mu\text{M}$ y la reacción se inició con ATP-Tris 5 mM. La fluorescencia se siguió a 580-640 nm.

2.14. ELECTROPORACIÓN DE LAS CÉLULAS COMPLETAS CON PIRANINA

La electroporación de la piranina se realizó de acuerdo con Peña *et al.* (1995), utilizando un Pulsador BioRad gene que contiene un controlador de pulso. La suspensión celular (0.7 ml) y 20 μl de piranina 100 mM se colocaron en una celda con 0.4 mm de separación, y se aplicó un pulso de 1500 V, 25 μF y 200 Ω , con una duración de aproximadamente 3 mS. Las células se centrifugaron y lavaron tres veces con agua por centrifugación en una microfuga Beckman por 10 seg; se resuspendieron en la relación original de 0.5 g/ml de agua, se mantuvieron en hielo y se utilizaron como se describe en cada experimento.

2.15. INTRODUCCIÓN DE PIRANINA A LA VACUOLA DE CÉLULAS INTACTAS

Después de la electroporación de 350 mg de células (peso húmedo), fueron incubadas en MES-TEA 10 mM, pH 6.0, glucosa 10 mM y KCl 10 mM en un volumen final de 5 ml durante 1 h a 30 °C en agitación suave. Las células fueron centrifugadas y lavadas tres veces con agua y resuspendidas en 0.7 ml de agua y utilizadas para los experimentos.

2.16. INTRODUCCIÓN DE LA PIRANINA A LA VACUOLA DE LOS ESFEROPLASTOS Y A VACUOLAS AISLADAS

Los esferoplastos (1 mg) se incubaron en Buffer B (MES-TEA 10 mM, pH 6.0, sorbitol 1.35 M, BSA 0.1%) conteniendo ATP-Tris 5 mM, MgSO_4 5 mM, vanadato de sodio 50 μM , piranina 3 μM , durante 1 h a 30°C en agitación suave. Los esferoplastos se centrifugaron, lavaron tres veces en Buffer B y se resuspendieron en el mismo medio. Las vacuolas (1 mg de proteína) se incubaron bajo las mismas condiciones, excepto que sin agregar vanadato de sodio.

2.17. MEDIDA DEL pH VACUOLAR EN ESFEROPLASTOS Y VACUOLAS AISLADAS

El pH vacuolar de los esferoplastos o de las vacuolas aisladas se midió de acuerdo con Peña *et al.* (1995), sin electroporación. Los esferoplastos (1 mg de proteína) o vacuolas preincubadas con piranina (ver arriba), se incubaron en 2 ml de MES-TEA 10 mM, pH 6.5, sorbitol 1.35 M, BSA 0.1% y $MgSO_4$ 5 mM. Los cambios de fluorescencia se siguieron a 460 nm y 520 nm. Los cálculos del pH se hicieron de acuerdo con Peña *et al.* (1995). La piranina total se calculó restando el valor de la fluorescencia con NH_4OH 100 mM, menos el valor con ácido propiónico al 50%. La piranina externa se evaluó por la fluorescencia a pH 8 (Bicina-TEA 10 mM, pH 8, sorbitol 1.35 M) menos el valor a pH 4 (ácido tartárico 10 mM, pH 4, sorbitol 1.35 M) y multiplicado por el factor de corrección 1.16. La piranina interna se calculó restando la piranina total menos la piranina externa. Se usaron los valores de fluorescencia corregidos correspondientes a las formas ácida y básica de la piranina para calcular el pH interno utilizando la ecuación de Henderson-Hasselbach con un valor de pKa de 7.2. Todos los cambios de fluorescencia fueron monitoreados a 460-520 nm, con una rendija de 4 nm (para ambas longitudes de onda) en un espectrofluorómetro DMX-1000 equipado con una cámara con temperatura regulada y un agitador magnético, conectado a un sistema de adquisición de datos (SLM Instruments; Urbana, IL, USA).

2.18. MICROSCOPIA CONFOCAL

Las imágenes confocales se obtuvieron con un sistema de barrido láser MCR 1024 BIO-RAD equipado con una fuente de rayo láser enfriado con Kr/Ar y unido a un microscopio invertido Nikon TMD 300. Las imágenes se colectaron con un objetivo Nikon 40X de inmersión en aceite. Los esferoplastos de La Azteca con piranina dentro de la vacuola (ver arriba), se excitaron a 488 nm con luz láser y se recogió la luz emitida a 585 nm. Las imágenes confocales se observaron, procesaron y convirtieron a formato TIFF con el programa Confocal Assistant 4.2 Todd Clark.

2.19. PROTEÍNA

La proteína se determinó con el método de Peterson (1977).

2.20. REACTIVOS

Todos los reactivos utilizados fueron de la mayor calidad disponible. El manitol y el sorbitol utilizados para los amortiguadores se desionizaron a través de la resina AG50W-X8 (Bio-Rad).

3. RESULTADOS

3.1. EFECTO DE LA NISTATINA SOBRE LA PERMEABILIDAD DE LAS LEVADURAS INTACTAS

El objetivo del presente trabajo fue llevar a cabo el estudio *in situ* del transporte del K^+ en la vacuola de la levadura. Antes de proceder a la preparación de esferoplastos permeables que permitieran el acceso directo a la vacuola, la primera prueba consistió en observar el efecto de la nistatina sobre la permeabilidad de la membrana plasmática en levaduras. Para esto se estimó el potencial de membrana con la cianina DiSC₃(3) (Peña *et al.*, 1984).

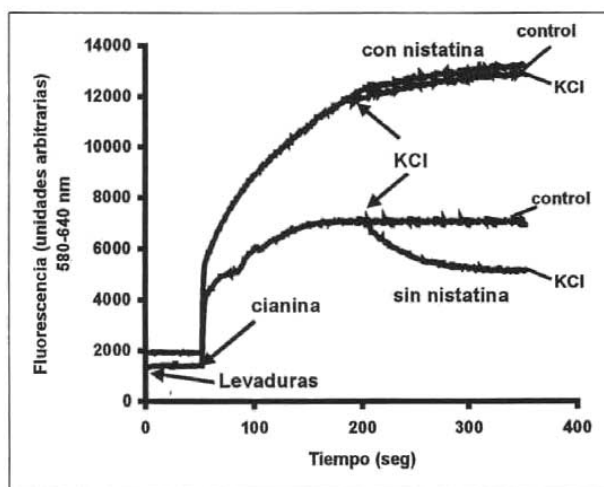


Fig. 1. Potencial de la membrana plasmática en levaduras intactas y tratadas con nistatina. Se registraron los cambios de fluorescencia del DiSC₃(3). La incubación se realizó en MES-TEA 10 mM, pH 6.0, CaCl₂ 100 μM, pentaclorofenol 10 μM y glucosa 50 mM. El trazo se inició con la adición de 25 mg de peso húmedo de levaduras tratadas o sin tratar 10 min con nistatina (20 μg/mg peso húmedo de levaduras). Se añadió 0.25 μM de cianina después de 10 seg y seguido por KCl 10 mM a los 200 seg. La fluorescencia se registró a 540-590 nm.

La cianina es un colorante fluorescente que se introduce a la levadura en respuesta al potencial de la membrana plasmática. Una vez dentro de la levadura, la fluorescencia de

este colorante se incrementa lo que constituye una medida cualitativa del $\Delta\psi$ en dicha membrana (Peña *et al.*, 1984). La Fig.1 muestra que las levaduras no tratadas con el antibiótico fueron capaces de establecer el potencial de membrana en presencia de glucosa, el cual además es abatido tras la adición de K^+ . En contraste con esto, en las levaduras tratadas 10 min con nistatina (20 $\mu\text{g}/\text{mg}$ peso húmedo de levaduras), la fluorescencia aumentó mucho más, probablemente por un aumento simple de la permeabilidad de la membrana, pero la adición de K^+ no provocó ningún cambio significativo en la fluorescencia, lo cual demostró que el transporte de K^+ a través de la membrana plasmática se encontraba abatido.

3.2 RESPIRACIÓN MITOCONDRIAL EN ESFEROPLASTOS

Una vez comprobado el efecto permeabilizante de la nistatina en las levaduras, se procedió a la preparación de los esferoplastos permeabilizados. De acuerdo con Avéret *et al.* (1998), la nistatina agregada a los esferoplastos torna permeable su membrana plasmática dando lugar a una mayor respiración en los esferoplastos que en las levaduras intactas con sustratos externos.

Procedimos a determinar la concentración óptima de nistatina capaz de acelerar la respiración en esferoplastos pero sin causar alteraciones en la mitocondria, es decir, que en teoría, permeabilizara la membrana plasmática pero mantuviera acopladas las mitocondrias. Para esto se prepararon esferoplastos y se midió la respiración con ácido láctico en presencia de distintas concentraciones de nistatina.

La Tabla 1 muestra que la incubación de los esferoplastos con nistatina 2.5 μM y 5 μM aceleró la respiración sin ADP. En contraste con lo anterior, en presencia de ADP la respiración disminuyó. A mayores concentraciones de nistatina el efecto estimulador desapareció, y la respiración fue menor que en el ensayo sin nistatina, sobre todo en presencia de ADP. Lo anterior se ve reflejado en el valor de los cocientes Edo3/Edo4 para cada caso (cabe hacer notar que a dicho cociente no se le denomina coeficiente respiratorio (CR) porque no se utilizó la mínima concentración de ADP requerida). Además se realizó un control de respiración en levaduras intactas en las cuales se observó estimulación de la respiración con ácido láctico pero no con ADP (no se muestra).

En estos experimentos mostraron que: a) en ausencia de nistatina se presentó la mayor velocidad de respiración, lo que significa que los esferoplastos son permeables aún sin nistatina; b) los esferoplastos sin nistatina mostraron la respiración mitocondrial mejor acoplada y, c) aún a baja concentración, la nistatina desacopla la respiración en los esferoplastos.

Tabla 1. Respiración de esferoplastos con lactato e incubados con nistatina

Conc. Nistatina ($\mu\text{g}/\text{mg prot}$)	natg $\text{O}_2/\text{min}/\text{mg}$		Edo3/ Edo 4
	Edo 4	Edo 3	
Sin ADP	Con ADP		
0	224 \pm 8	559 \pm 7	2.5
2.5	250 \pm 9	525 \pm 5	2.1
5	243 \pm 8	364.5 \pm 7	1.5
10	220 \pm 7	286 \pm 6	1.3

Tabla 1. Velocidad de consumo de oxígeno en esferoplastos con lactato y distintas concentraciones de nistatina. Se aerearon durante 30 min a 30°C 2 mg de proteína de esferoplastos de levadura crecida en lactato y bajo aereación vigorosa y se incubaron en un volumen total de 5 ml de buffer con sorbitol 1 M, NaCl 1.7 mM, MgSO_4 2 mM, KH_2PO_4 10 mM, EGTA 0.5 mM y BSA 0.1% pH 6.8. Se midió el consumo de oxígeno con lactato 10 mM y ADP 0.1 mM. En los ensayos con lactato se adicionó NAD^+ 2 mM y la nistatina fue añadida al inicio de la incubación a la concentración correspondiente ($\mu\text{g}/\text{mg}$ proteína de esferoplastos). Los resultados se expresan como natg O_2/mg proteína consumidos y son el promedio de tres experimentos \pm S.D.

Los resultados obtenidos cambiaron la concepción inicial que teníamos acerca de la preparación de esferoplastos permeables. En la mayoría de estos los trabajos reportados se utiliza un agente permeabilizante (Manon y Guérin, 1997; Avéret *et al.*, 1998; Noubhani *et al.*, 2000). En este caso se observó que después del tratamiento con zimoliasa, la membrana plasmática de los esferoplastos sufría una alteración, de naturaleza aún desconocida, pero que aparentemente permitía el acceso de moléculas como el ADP al interior de los esferoplastos, el cual en levaduras intactas no estimuló la respiración (no se muestra). Además, los esferoplastos mantuvieron la funcionalidad de los organelos internos. Esto es semejante al reporte en el cual se estudió el transporte vacuolar de Ca^{2+} en esferoplastos de

Candida parapsilosis sin la aplicación de ningún permeabilizante (Milani *et al.*, 2001), con la única diferencia de que en dicho trabajo los esferoplastos se prepararon con liticasa.

Se procedió a medir la respiración con otros sustratos y a comparar la respuesta observada. El lactato es transportado al interior de la levadura a través del antiportador Jen1p, también capaz de transportar piruvato (Casal *et al.*, 1995; De Hertogh *et al.*, 2002). Se utilizó glucosa, la cual es transportada a través de los transportadores Hxtp (Elbing *et al.*, 2004) y etanol, libremente permeable en las membranas biológicas. La Tabla 2 muestra la estimulación de los esferoplastos sin sustrato.

**Tabla 2. Velocidad de consumo de oxígeno en esferoplastos
natg O₂/min/mg**

Sustrato	Edo. 4		Edo. 3		% estimulación	
	Sin ADP	Con ADP	Sin ADP	Con ADP	Edo3/ Edo 4	
Ninguno	105± 9	-----	-----	-----	-----	
Lactato	224± 8	559 ± 7	113	432	2.5	
Piruvato	177± 18	406 ± 11	69	286	2.3	
Glucosa	169 ± 10	334 ± 26	61	218	2.0	
Etanol	153 ± 12	275 ± 18	46	161	1.8	

Tabla 2. Consumo de oxígeno en esferoplastos con distintos sustratos. 2 mg de proteína de esferoplastos obtenidos de levaduras La Azteca crecidas en láctico y bajo aereación vigorosa, fueron aereados 30 min a 30°C e incubados en un volumen total de 5 ml de buffer con sorbitol 1 M, NaCl 1.7 mM, MgSO₄ 2 mM, KH₂PO₄ 10 mM, EGTA 0.5 mM y BSA 0.1% pH 6.8. Se midió el consumo de oxígeno utilizando 10 mM para cada sustrato (excepto para etanol que se utilizó a 109 mM) y ADP 1 mM. En los ensayos con lactato y etanol se adicionó NAD⁺ 2 mM y con glucosa se adicionó ATP-Tris 2 mM, NAD⁺ 2 mM y NH₄Cl 10 mM. Los porcentajes se expresan con respecto al control sin sustrato y sin ADP. Los resultados se expresan como natg O₂/mg proteína consumidos y son el promedio de tres experimentos ± S.D.

En el Estado 4, la respiración con piruvato y lactato se aceleró entre un 70% y más del 100% respectivamente con respecto al control sin sustrato. Con glucosa y etanol también se aceleró de manera significativa. Lo más interesante es que los valores de Edo3/Edo4

mostraron un buen acoplamiento mitocondrial en todos los casos. Este experimento comprobó la permeabilidad de los esferoplastos y que es posible llevar a cabo estudios *in situ* de respiración mitocondrial gracias a que el ADP ingresa a los esferoplastos permeabilizados y las mitocondrias muestran una respiración acoplada.

En otra serie de experimentos (no mostrados), se observó que el desacoplante CCCP (2.5 μM) estimula la respiración. Con el fin de conocer el efecto de la zimoliasa en otras cepas, se realizaron estudios similares en esferoplastos y levaduras de la cepa BY4742. Con respecto a la respiración con distintos sustratos, se obtuvieron resultados muy semejantes en la cepa BY4742 en relación a los de La Azteca (no mostrados).

La Tabla 3 muestra la respiración de las levaduras intactas de La Azteca en presencia de los mismos sustratos utilizados anteriormente en los esferoplastos (Tabla 2).

Tabla 3. Velocidad de consumo de oxígeno en levaduras

SUSTRATO	natg O ₂ /min/mg	Porcentaje estimulación con sustrato
Ninguno	24.4 \pm 7.1	-----
Lactato	28.6 \pm 8.6	17.1
Piruvato	34.7 \pm 10	42
Glucosa	28.2 \pm 9.3	15.4
Etanol	33.4 \pm 9.5	36.7

Tabla 3. Velocidad de consumo de oxígeno en levaduras con distintos sustratos. Se utilizaron levaduras La Azteca crecidas con lactato bajo aereación vigorosa, como se describe en Materiales y Métodos. Se incubaron 25 mg de peso húmedo de levaduras en HEPES-TEA 10 mM, pH 7. Cada uno de los sustratos se utilizó a 10 mM, excepto para el etanol cuya concentración fue de 109 mM. Los porcentajes se expresan con respecto al control sin sustrato. Los resultados se expresan como natg O₂ consumido por min por mg de peso húmedo de levaduras y son el promedio de tres experimentos \pm S.D.

Las levaduras transportan los sustratos y la respiración con piruvato fue mayor que con lactato. Este fenómeno ya ha sido descrito por De Hertogh *et al.* (2000) quien reporta que la V_{max} para el piruvato del transportador Jen1p es mayor que para el lactato. Además, fue mucho mayor la estimulación de la respiración en los esferoplastos en relación con las levaduras. Para el caso del lactato y en ausencia de ADP, en los esferoplastos se estimula casi siete veces más que en las levaduras, debido a la permeabilidad de estos.

3.3. POTENCIAL DE LA MEMBRANA PLASMÁTICA

La entrada de sustratos mitocondriales en los esferoplastos fue un importante indicio de la alteración de la permeabilidad de la membrana plasmática. Por lo tanto, se estimó conveniente llevar a cabo una evaluación cualitativa del potencial de membrana plasmática en esferoplastos y compararlo con el de levaduras intactas. Se aplicó la técnica descrita por (Peña *et al.*, 1984) en la cual se utiliza la cianina como sonda fluorescente. La Fig. 2 muestra los cambios de fluorescencia de DisSC₃ (3) de las levaduras y los esferoplastos incubados con glucosa y el efecto del KCl sobre el potencial de la membrana plasmática.

En las levaduras (trazos inferiores) se observó un aumento de la fluorescencia que indica la existencia de potencial de membrana plasmática producido por la H^+ -ATPasa plasmática, y el incremento de la fluorescencia es la respuesta de la cianina al ser internalizada por las levaduras (Peña *et al.*, 1984). La existencia del potencial se verifica por la adición de KCl. Debido a que el transporte de KCl en las células se lleva a cabo gracias al potencial de membrana (negativo en el interior), la entrada de K^+ en la levadura abate el potencial de la membrana plasmática, produciendo una disminución en la fluorescencia.

Los esferoplastos mostraron un comportamiento muy distinto al de las levaduras. Se observó un incremento mayor de la fluorescencia por la entrada del colorante, independiente del potencial de la membrana plasmática. Lo anterior se verificó con dos observaciones: a) la fluorescencia de la cianina decrece lentamente con el tiempo y, b) el KCl no abate el potencial de la membrana plasmática de los esferoplastos.

Estos resultados demostraron que la membrana plasmática de los esferoplastos se encontraba permeabilizada y que tanto el potencial de la membrana plasmática como el transporte del K^+ a través de dicha membrana, se encontraban abatidos.

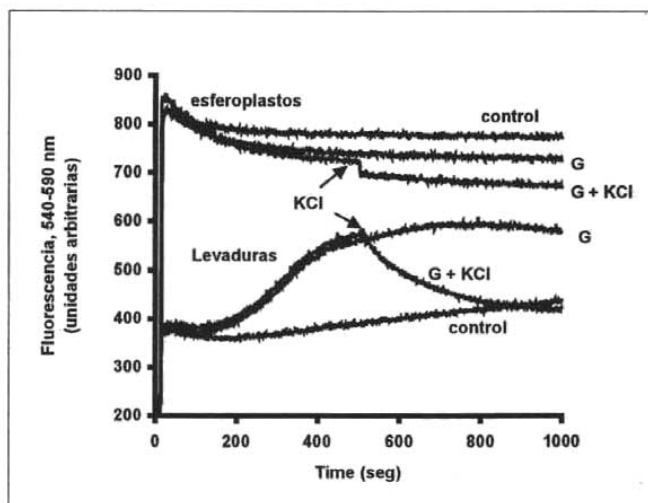


Fig. 2. Potencial de la membrana plasmática en levaduras intactas y esferoplastos. Se registraron los cambios de fluorescencia del DiSC₃(3). La incubación se realizó en MES-TEA 10 mM, pH 6.0, sorbitol 1.35 M, CaCl₂ 100 μM, pentaclorofenol 10 μM con o sin glucosa (G) 50 mM. El trazo se inició por la adición de 2 mg de proteína de esferoplastos o 25 mg de peso húmedo de levaduras. Se añadió 250 nM de cianina después de 10 seg, seguido por KCl (K⁺) 10 mM a los 500 seg. La fluorescencia se registró a 540-590 nm.

3.4. PRODUCCIÓN DE NADH

En vista de que nuestro principal objetivo fue estudiar el transporte a través de la vacuola, el cual depende de la actividad de la V-ATPasa, era indispensable conocer el estado energético de los esferoplastos y más específicamente su capacidad fermentativa.

En el laboratorio contamos con una técnica que muestra de manera rápida la capacidad fermentativa de las levaduras y en este caso de los esferoplastos. La aparición de un pico de NADH en las levaduras incubadas con glucosa fue descrito por Peña *et al.* (1967). La adición de glucosa levaduras ayunadas provoca un aumento del NADH producido en la primera parte de la glucólisis debido a la oxidación del gliceraldehído 3-fosfato. Posteriormente, los niveles de NADH retornan a las concentraciones basales debido a que la descarboxilación del piruvato a acetaldehído utiliza NADH.

La Fig. 3 muestra los niveles de NADH en levaduras y esferoplastos después de la adición de glucosa. En las levaduras ayunadas (trazos inferiores), el comportamiento fue como el que se ha descrito (Peña *et al.*, 1967). Y puesto que el KCl acelera la glucólisis, su adición provoca una mayor aparición de NADH. En este último proceso el incremento del pH citoplásmico también juega un papel importante (Peña *et al.*, 1967, 1969).

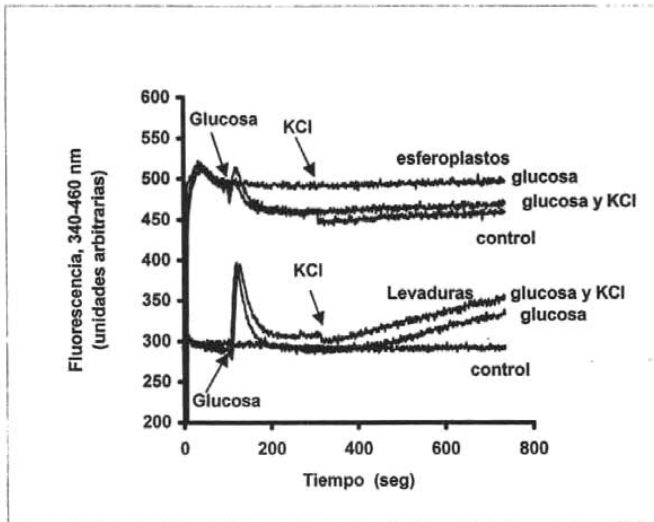


Fig. 3. Producción de NADH en esferoplastos y levaduras. Medio de incubación: MES-TEA 10 mM, pH 6.0, sorbitol 1.35 M. Se utilizaron 25 mg de peso húmedo de levaduras o 1 mg de proteína de esferoplastos previamente aerados durante 30 min a 30°C. Se observó el efecto de la glucosa 50 mM y KCl 50 mM, y la producción de NADH en esferoplastos y levaduras fue monitoreada por cambios en la fluorescencia a 340-460 (ex/em).

En contraste con lo anterior, la producción de NADH en los esferoplastos no se incrementa con la adición de glucosa ni de KCl. La falta de respuesta a la glucosa y al K^+ en los esferoplastos se debió probablemente a la liberación de los cofactores de la glucólisis, debido a la permeabilidad de la membrana plasmática. De hecho, la respiración mitocondrial con glucosa como sustrato requirió de cofactores como ATP, ADP y NH_4Cl (ver Tabla 2).

Estos resultados mostraron que los esferoplastos presentan una glucólisis abatida. Este hecho fue una ventaja para el modelo porque no fue necesario inhibir la glucólisis en los esferoplastos. De esta forma, no se encontró interferencia de esta ruta metabólica en el estudio del transporte en la vacuola *in situ*; ya que para realizar dicho estudio el factor principal es el control del estado energético del sistema del cual depende la principal enzima vacuolar, la V-ATPasa.

3.5. LIBERACIÓN DE NUCLEÓTIDOS, PROTEÍNAS Y ACTIVIDAD DE UNA ENZIMA CITOPLÁSMICA

La Fig. 4 muestra la curva de seguimiento de la formación de esferoplastos. El rendimiento en la formación de los éstos se cuantificó por el cambio de densidad óptica (DO) a 660 nm. Se tomaron alícuotas a distintos tiempos de incubación de las levaduras con zimoliasa. Los esferoplastos presentes se lisaron en agua destilada provocando la disminución de la absorbancia a 660 nm. La Fig. 4 muestra un rendimiento del 80% a los 20 min en la producción de esferoplastos (curva de lisis de esferoplastos en agua destilada). El porcentaje restante (20%), corresponde a los esferoplastos que se lisaron en el medio de cultivo durante la incubación y sin lisis en agua destilada (curva control de lisis). Los resultados obtenidos con la cepa BY4742 fueron muy similares a los de La Azteca (no se muestran).

La permeabilidad de la membrana plasmática de los esferoplastos se evaluó por la liberación de nucleótidos y de proteínas, así como por la actividad de una enzima citosólica cuantificada con sustrato externo. La Fig. 4 muestra que la liberación de nucleótidos y de proteínas siguió un patrón paralelo al de la aparición de los esferoplastos (seguida por la disminución de la DO a 660 nm). Conforme se van formando los esferoplastos permeables, se liberan al medio nucleótidos de su interior y proteínas provenientes de la pared celular degradada y del espacio periplásmico (ver sección 4.2 de Discusión). A su vez, la actividad de una enzima citosólica (glucosa 6-P deshidrogenasa), con la adición externa del sustrato (glucosa 6-P y NADP⁺), mostró un incremento paralelo al de la liberación de nucleótidos y proteínas.

Estos resultados comprobaron que los esferoplastos de ambas cepas (La azteca y BY4742) eran permeables después de la incubación con zimoliasa y sin necesidad de adicionar ningún agente permeabilizante extra.

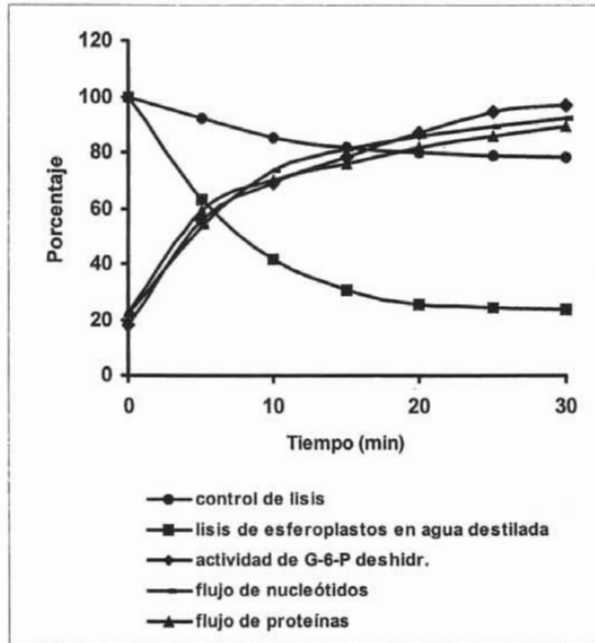


Fig. 4. Liberación de nucleótidos, proteínas y actividad de glucosa 6-fosfato deshidrogenasa durante la formación de esferoplastos. Se incubaron con zimoliasa levaduras cosechadas en la fase exponencial en YPD y ayunadas para convertirlas en esferoplastos (ver Materiales y Métodos). Se tomaron alícuotas a distintos tiempos de incubación para realizar los siguientes ensayos. *Círculos*) Los esferoplastos fueron diluidos en buffer B y se observó el cambio de DO a 660 nm con respecto al valor a 0 min. *Cuadros*) Los esferoplastos se lisaron en agua destilada y los valores se expresan como el porcentaje de disminución de la DO a 660 nm. *Romboides*) La actividad de la glucosa 6-fosfato deshidrogenasa se midió como se describió en Materiales y Métodos. La absorbancia a 340 nm se siguió durante 5 min a 25°C. *Línea*) Para medir la salida de nucleótidos, los esferoplastos se agitaron suavemente y se centrifugaron, y los nucleótidos se midieron a 260 nm en el sobrenadante desproteinizado. *Triángulos*) Para medir el flujo de proteína, los esferoplastos se agitaron y centrifugaron y la proteína se midió en el sobrenadante a 280 nm.

3.6. CUANTIFICACIÓN DEL POTASIO EN LOS ESFEROPLASTOS (POTASIO VACUOLAR)

La permeabilidad de la membrana plasmática de los esferoplastos provocó la pérdida del potasio citoplásmico; sin embargo, en vista de que la vacuola mantiene su integridad (ver secciones 3.8, 3.9 y 3.10), fue posible cuantificar el potasio vacuolar.

Tabla 4. Contenido de K^+ ($\mu\text{equiv./g}$ peso húmedo) en levaduras intactas y esferoplastos (vacuolar)

La Azteca	Levaduras intactas	Esferoplastos (vacuola)
No ayunadas	125 \pm 12	69 \pm 8
Ayunadas	75 \pm 8	26.3 \pm 7

BY4742	Levaduras intactas	Esferoplastos (vacuola)
No ayunadas	101.8 \pm 10	41.5 \pm 9
Ayunadas	65.8 \pm 8	23 \pm 6

Tabla 4. Se diluyó una cantidad equivalente de peso húmedo de levaduras o esferoplastos (20 mg) en 5 ml de MES-TEA 10 mM (pH 6.0), 1.35 M sorbitol. Las suspensiones se incubaron a ebullición en baño María durante 20 min y se centrifugaron, utilizando el sobrenadante para medir la concentración del ion potasio en un flamómetro Zeiss PF5. Los resultados se indican en $\mu\text{equiv. } K^+/\text{g}$ de peso húmedo de levaduras o esferoplastos y son el promedio de tres experimentos \pm S.D.

La Tabla 4 muestra el porcentaje del potasio en los esferoplastos y en las levaduras. En el caso de La Azteca, los esferoplastos preparados de levaduras no ayunadas ($[K^+]$ total 250 mM o 125 $\mu\text{equiv. } K^+/\text{g}$ peso húmedo de levadura) mantuvieron un 55% del potasio inicial mientras que los preparados de levaduras ayunadas ($[K^+]$ total 150 mM o 75 $\mu\text{equiv. } K^+/\text{g}$ peso húmedo de levadura) retuvieron solamente 35% de este catión. En el caso de la cepa BY4742, el porcentaje de retención fue de 41.8% y 27% respectivamente. Estos resultados muestran el alto porcentaje de potasio que la vacuola es capaz de almacenar, en coincidencia con el importante papel que ha sido adjudicado a este organelo en la

homeostasis iónica de la levadura (Klyonsky *et al.*, 1990) y en que este organelo almacena hasta ocho veces más K^+ que el citosol (Okorokov *et al.*, 1980).

Por otra parte, es importante observar que las levaduras perdieron el 40% y 35.4% en las cepas La Azteca y BY4742 respectivamente, después de haber sido ayunadas. Pero en el caso de los esferoplastos, la pérdida fue mayor de 62% y 45.9% respectivamente. Estos datos sugieren que parte del potasio vacuolar se libera hacia el citoplasma durante el ayuno, y apunta aún más hacia el importante papel de la vacuola en la regulación de las concentraciones internas del K^+ en la levadura.

3.7. ACTIVIDAD DE LAS ATPasas

Se midió la actividad de las tres distintas ATPasas, utilizando inhibidores específicos: bafilomicina A_1 para la V-ATPasa, dietilestilbestrol (DES) para la ATPasa plasmática, azida de sodio para la F-ATPasa y molibdato de amonio para las fosfatasa. Con un 64% de inhibición de la actividad con DES, la mayor actividad fue para la ATPasa plasmática, en coincidencia con Serrano (1980) quien reporta que la actividad de la ATPasa plasmática representa el mecanismo de mayor consumo de ATP en la levadura. En vista de la alta actividad de esta enzima, se añadió vanadato de sodio 50 μM en varios ensayos realizados en este trabajo (en cada uno se indica).

El porcentaje de inhibición con la bafilomicina A_1 mostró que el 25% de la actividad correspondía a la V-ATPasa. Por último, no se observó ningún efecto de la azida de sodio sobre la actividad de ATPasa. Eso muestra la ausencia de actividad de F-ATPasa. Experimentos realizados en el laboratorio con mitocondrias aisladas demostraron que la actividad de F-ATPasa es muy baja, que no es estimulada por desacoplantes y que solamente puede ser medida en medios hipotónicos o en presencia de agentes permeabilizantes lo cual coincide con lo reportado por Venard *et al.* (2003). Sin embargo, se añadió oligomicina (5 $\mu g/mg$ prot.) a todos los ensayos para evitar cualquier posible interferencia de esta enzima. En los ensayos de ATPasa realizados en presencia de más de un inhibidor se obtuvieron resultados congruentes con el porcentaje de inhibición obtenido con cada uno por separado y además, el ensayo realizado en presencia de los tres inhibidores presentó una inhibición del 90% de la actividad total.

Tabla 5. Actividad de ATPasa en esferoplastos de La Azteca

Inhibidor	nmol Pi/mg/min	% inhibición
Ninguno	96 ± 15	0
Bafilomicina A ₁ (10 µM)	72 ± 12	25
DES (2.5 mM)	34 ± 8	64.2
Azida de sodio (2 mM)	97 ± 9	0
DES y azida de sodio	33 ± 9	65.7
DES y Bafilomicina A ₁	9 ± 3	90.4
Azida de sodio y Bafilomicina A ₁	73 ± 10	23.7
Los tres inhibidores	9 ± 4	90.5

Tabla 5. Actividad de ATPasa en esferoplastos de La Azteca. Se utilizaron esferoplastos (ver Material y Métodos). La actividad de ATPasa se midió de acuerdo con Calahorra *et al.* (1987) con algunas modificaciones. El ensayo se realizó con 0.25 mg de proteína en 250 µl de MES-TEA 10 mM (pH 6.0), MgCl₂ 5 mM, ATP-Tris 0.5 mM y molibdato de amonio 1 mM. Donde se indica, se añadió bafilomicina 10 µM, dietilestilbestrol (DES) 2.5 mM y azida de sodio 2 mM. La reacción se inició con la adición de la proteína. La mezcla se incubó 10 min a 30°C. La reacción se detuvo con ácido tricloroacético, y los tubos se transfirieron a un baño de hielo; se centrifugaron, y el fosfato liberado fue medido en el sobrenadante por el método de Fiske y Subbarow (1925).

3.8. TRANSPORTE DEL POTASIO EN LOS ESFEROPLASTOS

La permeabilidad de la membrana plasmática permitió seguir el transporte de potasio a la vacuola. La Fig. 5 muestra el transporte de potasio en la vacuola de los esferoplastos, mediante un electrodo selectivo para el catión.

En la Fig. 5 se observa que la adición de ATP-Mg²⁺ provoca la desaparición del potasio externo. Dicho fenómeno se inhibió con la bafilomicina A₁, inhibidor específico de la V-ATPasa, lo cual sugiere que el potasio fue transportado a la vacuola. Además, la adición de pentaclorofenol (PCF) también revirtió el efecto del ATP-Mg²⁺, indicando el requerimiento del gradiente de protones a través de la membrana vacuolar para la entrada del potasio. Se observó además un efecto del derivado de la amilorida sobre el transporte de potasio; 5 µM del compuesto provocó una salida considerable de este catión.

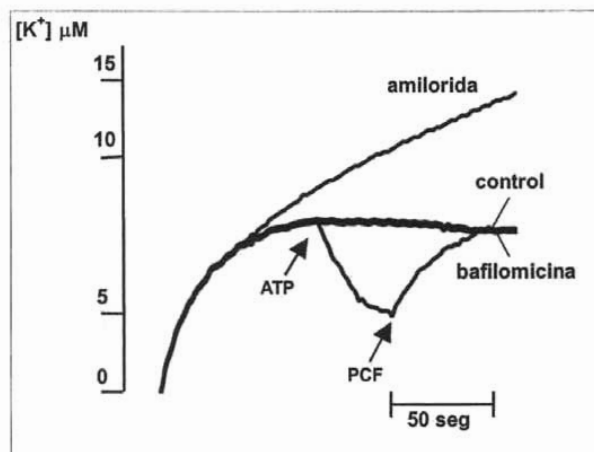


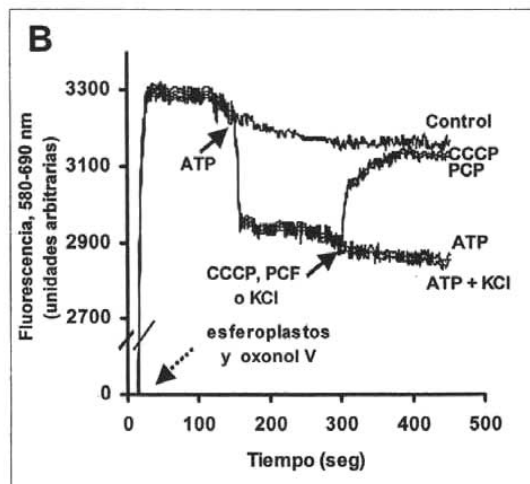
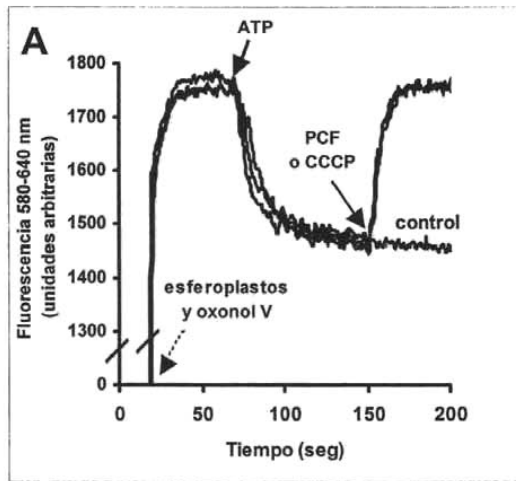
Fig. 5. Transporte de ion potasio en esferoplastos de La Azteca. Los esferoplastos se incubaron como sigue: 1 mg de proteína de esferoplastos en MOPS 1 mM, pH 7.0, sorbitol 1.35 M, BSA 0.1%, vanadato de sodio 50 μM y oligomicina 5 $\mu\text{g}/\text{mg}$ prot., en un volumen final de 5 ml a 30 $^{\circ}\text{C}$. Los trazos se iniciaron después de 10 seg con la adición de los esferoplastos; ATP- Mg^{2+} 5 mM o PCF 10 μM se añadieron donde se indica. En los trazos con bafilomicina A_1 10 μM y con el derivado de la amilorida (5-[N,N-hexametilen]-amilorida) 5 μM , ambos inhibidores fueron añadidos desde el principio.

3.9. POTENCIAL DE LA MEMBRANA VACUOLAR

La Fig. 6A muestra los cambios de fluorescencia del oxonol V como indicador del potencial de membrana de la vacuola ($\Delta\psi$) en los esferoplastos. La actividad de la V-ATPasa, con la adición de ATP- Mg^{2+} , estableció el potencial de membrana vacuolar. El $\Delta\psi$ vacuolar favorece la acumulación del oxonol V en la vacuola, que se observó como una disminución de la fluorescencia después de la adición del ATP. Los desacoplantes como CCCP y PCF abaten el $\Delta\psi$ vacuolar, produciendo un aumento de la fluorescencia. Resultados similares se observaron en la cepa BY4742 (Fig. 6B).

La Fig. 6C muestra que la bafilomicina A_1 , inhibidor de la V-ATPasa, impidió la creación del $\Delta\psi$ después de la adición del ATP. La adición de glucosa no produjo ninguna respuesta en el $\Delta\psi$, de acuerdo con el bajo nivel de la glucólisis en los esferoplastos. Por otra parte, en ambas cepas (Figs. 6B y 6C), la adición de KCl a alta concentración (200

mM) no provocó un cambio significativo en el $\Delta\psi$, lo cual sugirió que el transporte del ion potasio en la vacuola era independiente del potencial, probablemente por un intercambiador K^+/H^+ .



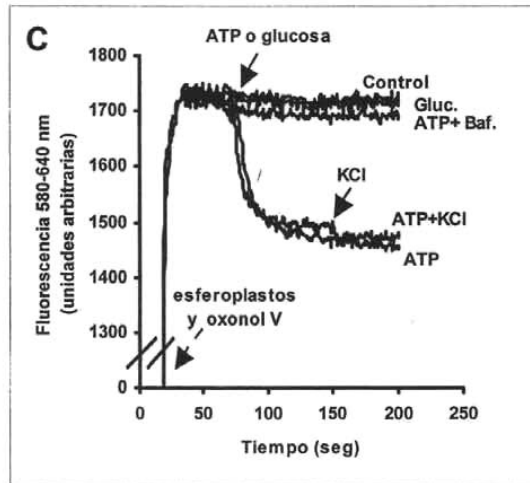


Fig. 6. Potencial de la membrana vacuolar en los esferoplastos. Se monitoreó el potencial de membrana vacuolar en esferoplastos siguiendo los cambios de fluorescencia a 580-640 nm (ex/em). La mezcla de incubación contenía: MES-TEA 10 mM (pH 6.0), sorbitol 1.35 M, $MgSO_4$ 5 mM, vanadato de sodio 50 μM , y oligomicina 5 $\mu g/mg$ proteína; en un volumen final de 2 ml. El trazo comenzó a los 5 seg por la adición de 1 mg de proteína de esferoplastos, seguido por 2 μM de oxonol V. A) Efecto del ATP-Tris 5 mM y de desacoplantes (PCF y CCCP) 10 μM en *La Azteca*. B) Efecto del ATP-Tris 5 mM, de desacoplantes (PCF y CCCP) 10 μM y de KCl 200 mM después de la adición de ATP en la cepa BY4742. C) Efecto de ATP-Tris 5mM en presencia de bafilomicina A_1 10 μM o de glucosa 10 mM y de KCl 200 mM después de la adición de ATP en *La Azteca*.

3.10. pH VACUOLAR

El pH vacuolar se cuantificó en esferoplastos con piranina en la vacuola. En contraste con las levaduras, la introducción de la piranina a la vacuola de los esferoplastos no requiere de electroporación, sino sólo de incubación con ATP- Mg^{2+} y el colorante. La Fig. 7A muestra los esferoplastos incubados con piranina en presencia de ATP- Mg^{2+} y la Fig. 7B en ausencia de ATP- Mg^{2+} . Además, la entrada de piranina a la vacuola se inhibió con bafilomicina y CCCP (no se muestra). Estos resultados muestran que la entrada de la piranina a la vacuola depende de la actividad de la V-ATPasa.

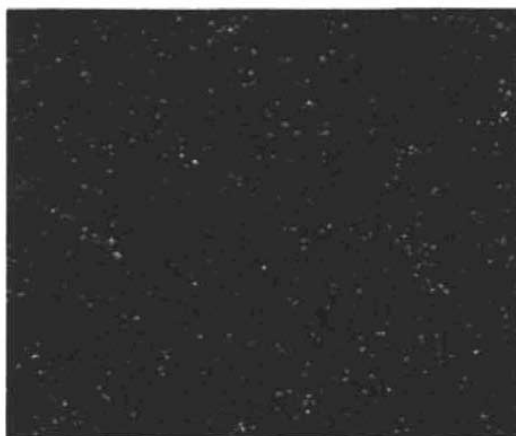
A**B**

Fig. 7. Entrada de la piranina a la vacuola en los esferoplastos. Para incorporar la piranina en la vacuola de los esferoplastos, se incubó 1 mg de proteína de esferoplastos 1 h a 30°C en agitación suave en MES-TEA 10 mM, pH 6, sorbitol 1.35 M, BSA 0.1% (Buffer B), con vanadato de sodio 50 μ M y piranina 3 μ M, en presencia (A) o ausencia (B) de ATP-Mg²⁺ 5 mM (ver Materiales y Métodos). Los esferoplastos se lavaron tres veces por centrifugación en Buffer B y al final se resuspendieron en este mismo.

La Fig. 8 muestra el efecto del ATP sobre el pH vacuolar. En presencia de ATP-Mg²⁺, la V-ATPasa bombea protones al interior de la vacuola provocando la disminución del pH vacuolar. El efecto del ATP-Mg²⁺ se inhibió por la bafilomicina A₁, lo cual demostró que, efectivamente, se trataba de la vacuola. Por otro lado, la pequeña alcalinización provocada por el K⁺ sugirió nuevamente la presencia de un antiportador K⁺/H⁺ en la membrana vacuolar.

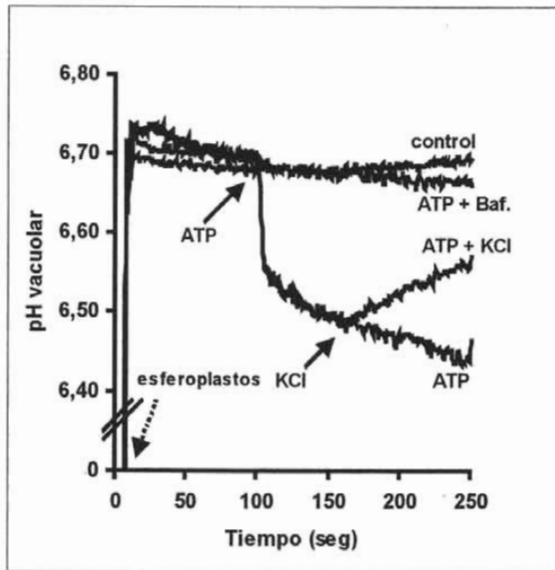
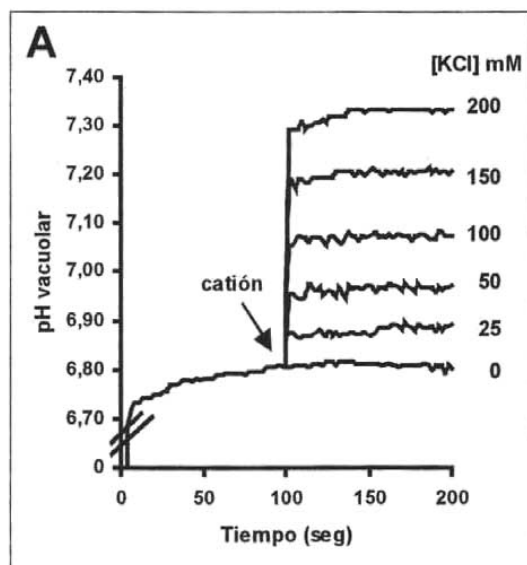


Fig. 8. pH vacuolar en esferoplastos. La piranina se incorporó a la vacuola según se indica en la Fig. 7. Los esferoplastos con piranina en la vacuola se incubaron en MES-TEA 10 mM (pH 6.5), sorbitol 1.35 M y MgSO₄ 5 mM. Los trazos se iniciaron con 1 mg de proteína de esferoplastos. Donde se indica, se añadió ATP-Tris 5 mM en presencia o ausencia de bafilomicina A₁ 10 μM y KCl 200 mM. Los cambios en la fluorescencia se siguieron a 460-520 nm y el pH fue calculado de acuerdo con Peña *et al.* (1995) (ver Materiales y Métodos).

La Fig. 9A muestra la alcalinización vacuolar provocada con concentraciones crecientes de KCl, el cual se añadió en ausencia de ATP para evitar la acidificación que éste provoca en la vacuola. Una de las características más sobresalientes del transporte de potasio a través de la membrana vacuolar fue la alta concentración de potasio requerida para que el

pH vacuolar alcanzara una respuesta significativa (25-200 mM). La Fig. 9B muestra el mismo experimento pero en la cepa BY4742. El mismo ensayo se realizó en vacuolas con piranina y se observó el mismo comportamiento (Fig. 9C). El mismo ensayo se realizó pero con concentraciones crecientes de NaCl obteniéndose los mismos resultados (no se muestra). Esto sugiere que ambos cationes, K^+ y Na^+ , son transportados a través del mismo transportador a la vacuola.



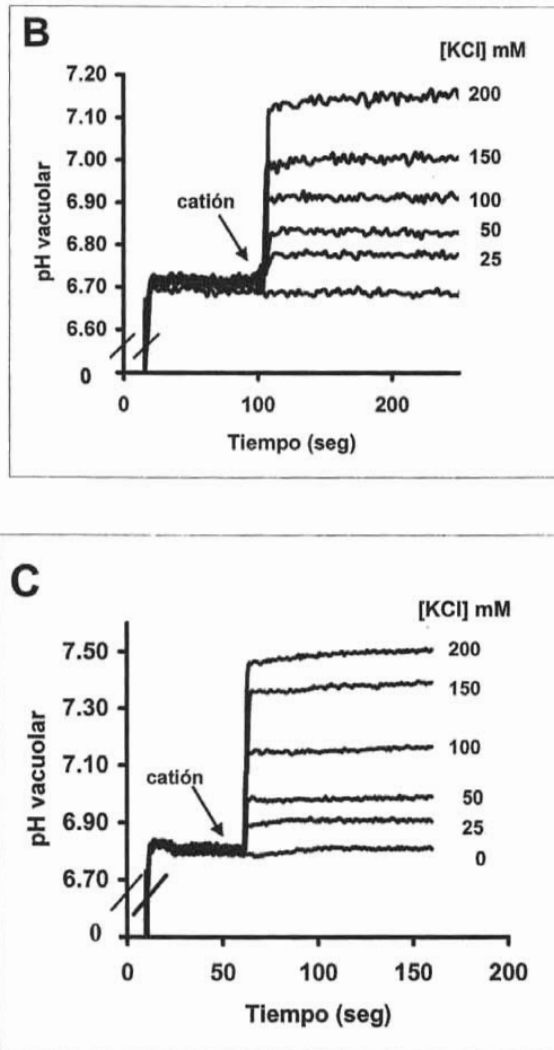
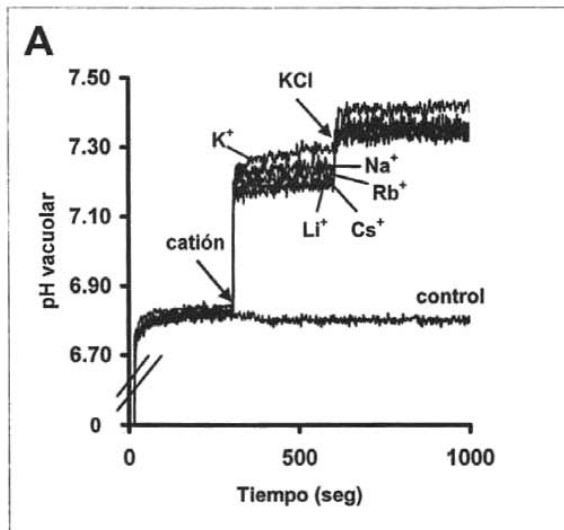


Fig. 9. Efecto del KCl sobre el pH vacuolar en esferoplastos y en vacuolas aisladas en ausencia de ATP-Mg²⁺. La piranina se incorporó en la vacuola de los esferoplastos como se indica en la Fig. 7. Las condiciones fueron las mismas que para las vacuolas aisladas, con la única diferencia de que la resuspensión final en el Buffer B no se añadió vanadato de sodio 50 μ M (ver Materiales y Métodos). Los esferoplastos con piranina en la vacuola (1 mg) o vacuolas aisladas (0.5 mg) con piranina en el interior, fueron incubadas en MES-TEA 10 mM, pH 6.5, sorbitol 1.35 M y MgSO₄ 5 mM. Los trazos se iniciaron con la adición de esferoplastos o vacuolas. El KCl se añadió a la concentración indicada a: A) esferoplastos de La Azteca, B) esferoplastos de la cepa BY4742 y, C) vacuolas aisladas de La Azteca. Los cambios de fluorescencia se monitorearon a 460-520 nm de acuerdo con Peña *et al.* (1995) (ver Materiales y Métodos).

C) vacuolas aisladas de *La Azteca*. Los cambios de fluorescencia se monitorearon a 460-520 nm de acuerdo con Peña *et al.* (1995) (ver Materiales y Métodos).

Con el objeto de caracterizar aún más el transporte del K^+ a la vacuola de los esferoplastos, se observaron los cambios de pH vacuolar con otros cationes monovalentes alcalinos de la misma familia del potasio. La Fig. 10A muestra la respuesta del pH vacuolar de los esferoplastos ante el cloruro de K^+ , Na^+ , Rb^+ , Li^+ y Cs^+ , y una segunda adición de KCl. La magnitud del aumento fue muy similar para todos los cationes. Se realizó un ensayo similar con la cepa BY4742 (Fig. 10B), pero con una sola adición de cationes. Los resultados también demuestran una inespecificidad por sustrato en el transporte de potasio.



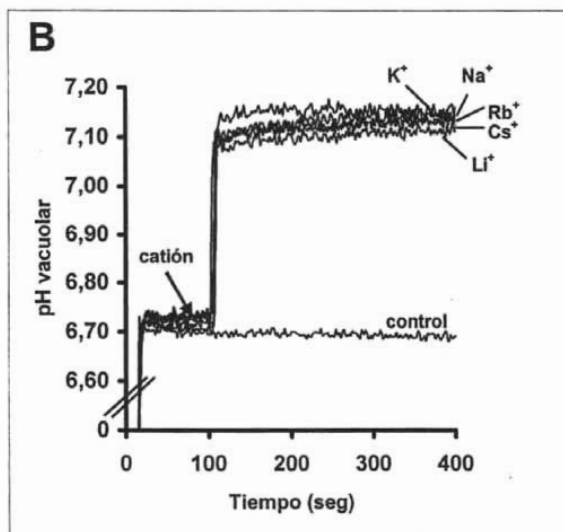


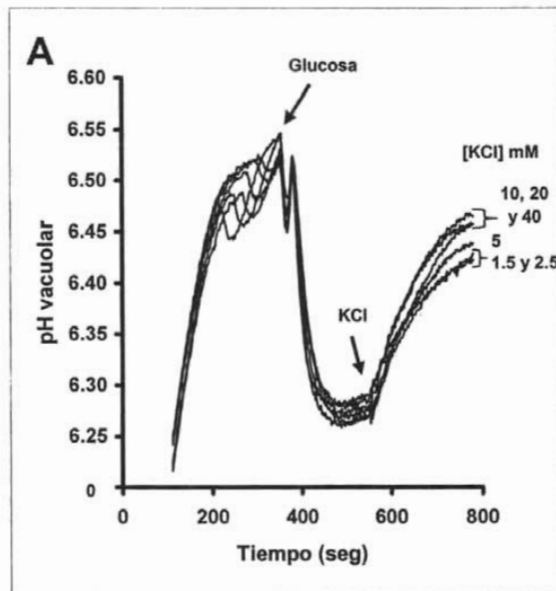
Fig. 10. Efecto de cationes monovalentes-alcalinos sobre el pH vacuolar en los esferoplastos. Las condiciones fueron como en a Fig. 9. Los esferoplastos con piranina en la vacuola se incubaron en MES-TEA 10 mM, pH 6.5, sorbitol 1.35 M y $MgSO_4$ 5 mM. Los trazos se iniciaron con 1 mg de proteína de esferoplastos. Donde se indica, se añadieron: A) 200 mM de cationes monovalentes-alcalinos (sales de cloruro de Na^+ , Rb^+ , Cs^+ o Li^+) y KCl 200 mM en la cepa La Azteca. B) En la cepa BY4742, se añadieron cationes monovalentes-alcalinos 200 mM (sales de cloruro de Na^+ , Rb^+ , Cs^+ o Li^+ donde se indica. Los cambios en la fluorescencia se monitorearon a 460-520 nm y el pH se midió de acuerdo con Peña *et al.* (1995) (ver Materiales y Métodos).

Los resultados obtenidos en los esferoplastos se compararon con la respuesta del pH vacuolar en las levaduras completas. La Fig. 11A muestra la acidificación de la vacuola tras la adición de glucosa a las levaduras. Posteriormente, la adición de concentraciones crecientes de KCl provocó la alcalinización vacuolar. Sin embargo, en el caso de las levaduras enteras, los cambios en el pH vacuolar requirieron de concentraciones de KCl diez veces menores a las observadas en los esferoplastos. El resultado más sorprendente fue la similitud entre el pH vacuolar en levaduras enteras con los cambios del pH citoplásmico en las mismas (Calahorra *et al.*, 1998).

En el caso de las levaduras intactas, el KCl provoca la mayor respuesta, seguido por el Rb^+ , y el Na^+ y el Li^+ no provocaron una respuesta importante (Fig. 11B). Un fenómeno sobresaliente fue que estos mismos cationes provocaron una respuesta similar tanto en el

pH citoplásmico como en el pH vacuolar en las levaduras enteras. Aparentemente, es la entrada de los cationes a la levadura lo que modula la alcalinización vacuolar y no su entrada a la vacuola.

Es decir, la vacuola se alcaliniza tras el incremento del pH citoplásmico debido a la adición de dichos cationes. Estos resultados sugieren que: a) la vacuola juega un importante papel en la regulación del pH citoplásmico y, b) el modelo de esferoplastos permeabilizados permite la cuantificación del pH vacuolar sin interferencia del pH citoplásmico.



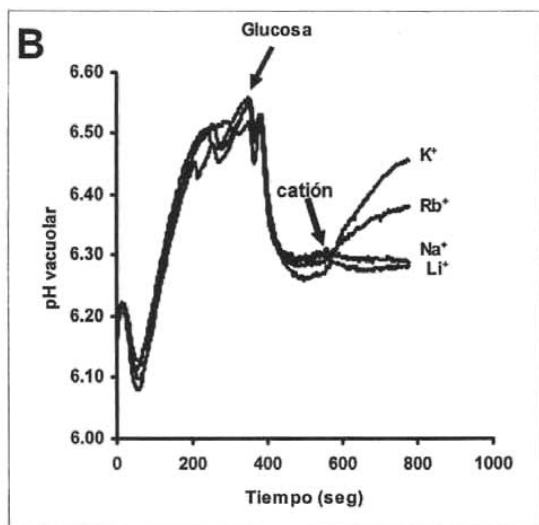


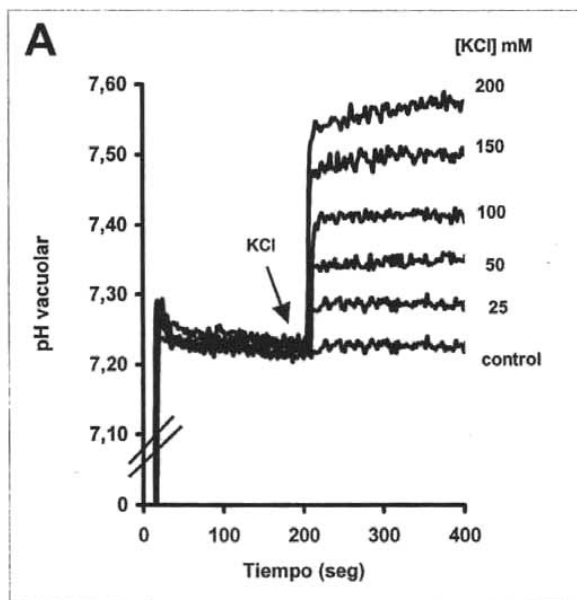
Fig. 11. pH vacuolar de levaduras completas y efecto del potasio y otros cationes. Se electroporaron levaduras crecidas 24 h en YPD y ayunadas 16 h en presencia de piranina. Y para la introducción de dicho colorante a la vacuola, las levaduras se incubaron con glucosa 10 mM y KCl 10 mM durante 1h a 30 °C. Al final de la incubación se lavaron tres veces por centrifugación con agua destilada y se resuspendieron en una relación final de 0.5 mg/ml en agua destilada (ver Materiales y Métodos). 25 mg de levaduras con piranina en la vacuola se incubaron en un volumen final de 2 ml de MES-TEA 10mM, pH 6 a 30°C en la celda del espectrofluorómetro. A) Se añadió glucosa 10 mM y KCl a las concentraciones indicadas según se muestra en la figura. B) Se añadió glucosa 10 mM y 10 mM de cloruros de los cationes monovalentes-alcalinos según se indica (K^+ , Na^+ , Rb^+ , Cs^+ o Li^+).

3.11. EL pH VACUOLAR EN LOS ESFEROPLASTOS DE LAS MUTANTES

$\Delta nhx1$

Dada la importancia del antiportador $Nhx1p$ (ver Introducción), se procedió a la caracterización del transporte de potasio a la vacuola de la mutante $\Delta nhx1$. En la Fig.12 se muestra que la mutante $\Delta nhx1$ presenta un comportamiento prácticamente idéntico al de la cepa silvestre (Figs. 9B y 10B). La entrada de KCl a la vacuola provocó la alcalinización de este organelo y al igual que en la cepa silvestre, también se requirieron altas concentraciones de KCl para lograr una respuesta significativa (25-200 mM). Estos resultados refuerzan que un antiportador K^+/H^+ lleva a cabo el transporte del K^+ en la vacuola; sin embargo, se

concluyó que el antiportador Nhx1p descrito por Nass y Rao (1998) no está involucrado en el transporte del K^+ a la vacuola de las levaduras.



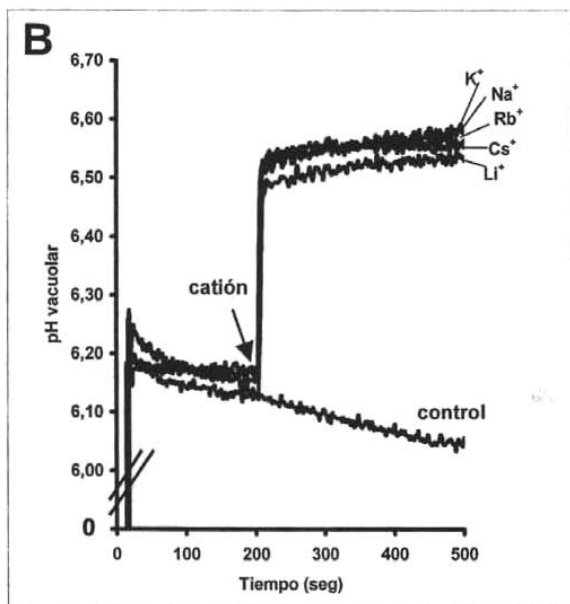


Fig. 12. pH vacuolar en esferooplastos de la mutante $\Delta nhx1$ y efecto de iones potasio y cationes monovalentes-alcalinos. Se prepararon esferooplastos y vacuolas aisladas de levaduras mutantes $\Delta nhx1$, a partir de levaduras crecidas en YPD-uracilo, cosechadas en la fase exponencial y ayunadas. El experimento fue similar al de la Fig. 9. Los esferooplastos con piranina en la vacuola, se incubaron en MES-TEA 10 mM, pH 6.5, sorbitol 1.35 M y $MgSO_4$ 5 mM. Los trazos se iniciaron con 1 mg de proteína de esferooplastos. Según se indica: A) Se añadió KCl a la concentración correspondiente y B) sales de cloruro de cationes monovalentes-alcalinos fueron añadidos a 200 mM (K^+ , Na^+ , Rb^+ , Cs^+ o Li^+).

También se ensayó la especificidad del transporte de potasio y la respuesta a diferentes cationes alcalinos (Fig. 12B); se observó la misma respuesta del pH vacuolar de la mutante $\Delta nhx1$ con el de la silvestre. El ion potasio es transportado a través de un transportador no específico; todos los cationes utilizados alcalinizan la vacuola en la misma magnitud en ambas cepas.

4. DISCUSIÓN

4.1. PROPIEDADES DE LOS ESFEROPLASTOS

Estudios previos de nuestro laboratorio sugirieron la existencia de un antiportador K^+/H^+ en la vacuola de la levadura (Calahorra *et al.*, 1998; Martínez, 1999). Dada la importancia del K^+ , el primer objetivo del presente trabajo fue establecer una técnica para el estudio *in situ* del transporte del K^+ en la vacuola de este microorganismo.

De las técnicas de permeabilización existentes (ver sección 1.6.2 en Introducción), el DEAE-dextran fue uno de los primeros compuestos utilizados en nuestro laboratorio para provocar la permeabilización de la membrana plasmática (Jiménez, 1997). Este polímero se ha utilizado para permeabilizar la membrana plasmática de *S. cerevisiae* y estudiar la vacuola (Huber-Wälchli y Wiemken, 1979; Theuvenet *et al.*, 1986). Sin embargo, nuestros estudios demostraron que la membrana plasmática de la cepa La Azteca no era sensible a este compuesto (Jiménez, 1997).

Otra opción fue el detergente CTAB (bromuro de cetil-trietil-amonio). Este compuesto también ha sido utilizado en la permeabilización de la membrana plasmática en diversos tipos celulares como *S. cerevisiae* y *K. fragilis* y con diversos fines, entre los que destaca la medida de enzimas intracelulares (Laouar *et al.*, 1992). El resultado más sobresaliente de dichos estudios fue que el CTAB, a una concentración de 20 $\mu\text{g}/\text{mg}$ peso húmedo de levaduras, permeabiliza la membrana plasmática de la célula y abate el potencial de membrana. Sin embargo, el problema más serio fue la interferencia del CTAB con los colorantes fluorescentes utilizados en los ensayos de ΔpH y del $\Delta\psi$ vacuolar (piranina y oxonol V). Esta interferencia imposibilitó la realización de dichos ensayos, por lo que su utilización para tales fines fue desechada.

Finalmente, se decidió aplicar la técnica de esferoplastos permeables, desarrollada por Avéret *et al.* (1998) para el estudio *in situ* de la fisiología mitocondrial, sólo que nuestros resultados mostraron que aún sin la aplicación de nistatina y tan solo con la incubación con

zimoliasa, los esferoplastos de ambas cepas estudiadas tenían una membrana plasmática permeable. Por ello, la principal modificación que se hizo fue eliminar cualquier agente permeabilizante (nistatina) del tratamiento de los esferoplastos. Ya ha sido reportado otro caso en el cual no es indispensable la aplicación de un agente permeabilizante a los esferoplastos, en el estudio del transporte del Ca^{2+} a la vacuola de *C. parapsilosis*, el cual se realizó en esferoplastos preparados con liticasa y sin agente permeabilizante (Milani *et al.*, 2001).

Los esferoplastos preparados en el presente trabajo presentaron las siguientes propiedades que hicieron posible la realización de la investigación:

- A. Parte del contenido citosólico fue liberado al medio exterior, como cofactores de la glucólisis, lo cual representa la ventaja de que se elimina la interferencia de esta vía metabólica en el estudio del transporte vacuolar.
- B. En los esferoplastos se mantuvo la integridad funcional y estructural de los organelos internos, hecho que permite estudiar el transporte vacuolar.
- C. La entrada de colorantes fluorescentes (piranina y oxonol V) y de diversos inhibidores de ATPasas y de antiportadores Na^+/H^+ (bafilomicina, DES, vanadato de sodio, azida de sodio, oligomicina y amilorida) permitió el estudio del transporte vacuolar en los esferoplastos y de los ensayos de ΔpH y del $\Delta\psi$ vacuolar.
- D. Debido a que se mantiene la estructura vacuolar y se libera el contenido citosólico en los esferoplastos permeables, se pudo cuantificar el potasio vacuolar.

4.2. EFECTO DE LA ZIMOLIASA EN LA MEMBRANA PLASMÁTICA

Tal y como se ha mencionado, existen reportes con resultados similares a los nuestros en los que otras levaduras tratadas con liticasa (*C. parapsilosis*), resultan en esferoplastos permeables (Milani *et al.*, 2001). Sin embargo, a la fecha no se ha reportado ningún estudio en torno al efecto que pueden tener las enzimas líticas sobre la membrana plasmática de las levaduras.

Si bien desconocemos el mecanismo por el que la zimoliasa aumenta la permeabilidad de la membrana plasmática, es posible que provoque la degradación de algunas de las proteínas presentes en ésta. Hay evidencias de que la incubación de las levaduras con un exceso de zimoliasa causa la degradación de proteínas de la membrana; tal es el caso de la H⁺-ATPasa plasmática de *Kluyveromyces lactis*, la cual se degrada en levaduras incubadas con un exceso de zimoliasa 20 T (ICN) (1 g zimoliasa/30g peso seco; comentario Dr. J. P. Pardo).

Estudios realizados con esferoplastos en regeneración han aportado información importante acerca de la composición de la pared celular de las levaduras (Pardo *et al.*, 1999). Se han analizado los componentes liberados al medio durante el tratamiento de las levaduras con distintos compuestos que alteran la pared celular, tales como β-mercaptoetanol y enzimas líticas como la zimoliasa (Eroles *et al.*, 1997; Angiolella *et al.*, 1996); ninguno de ellos se ha demostrado de manera contundente si la membrana plasmática mantiene su integridad después del tratamiento con dichos agentes.

Sí se ha reportado que después de la degradación de la pared celular, ciertas enzimas citosólicas son liberadas al medio, tal es el caso de la enolasa y la Hsp70 (*heat shock protein*), aunque se cree que su liberación responde a que dichas proteínas también se encuentran en el espacio periplásmico o porque se liberan de células lisadas (Eroles *et al.*, 1997). Sin embargo, no se ha estudiado la posibilidad de que dichas proteínas se liberen al medio debido a la alteración en la permeabilidad de la membrana plasmática de los esferoplastos.

En este trabajo también se observó una salida significativa de proteínas durante la formación de los esferoplastos con zimoliasa. Una parte importante de estas proteínas debe provenir tanto de la pared celular como del espacio periplásmico. Al eliminar la capa externa de la pared celular, la cual consiste de manoproteínas, se está eliminando la principal barrera que retiene a las proteínas periplásmicas (De Nobel *et al.*, 1990). Pero sería interesante averiguar si ciertas proteínas de origen citosólico también son liberadas al medio debido a la permeabilidad alterada de la membrana plasmática de los esferoplastos. Un primer indicio de la pérdida de enzimas glucolíticas es que, a pesar de que es posible reconstituir la glucólisis en esferoplastos permeables en presencia de cofactores de la

glucólisis como el ATP, el ADP y el NH_4Cl , la velocidad de la glucólisis en las levaduras intactas es mucho mayor que en los esferoplastos permeabilizados.

Para conocer más acerca del posible efecto de la zimoliasa sobre la membrana plasmática, es importante considerar la composición de la preparación enzimática. Esta enzima fue descrita originalmente por Kitamura *et al.* (1971) y posteriormente purificada por Kitamura y Yamamoto (1972) a partir del material lítico producido por *Arthrobacter luteus*. Según la descripción del proveedor (ICN), la enzima es una mezcla de enzimas líticas que consta de β -1,3-glucosidasa (1.5×10^6 unidades/g), proteasa (1×10^4 unidades/g), manasa (1×10^6 unidades/g) y trazas de amilasa, xilanas y fosfatasa. La actividad de β -1,3-glucanasa de la zimoliasa libera pentasacáridos del paquimano o laminarina y por otra parte, la actividad de manasa es también muy importante (Ovalle *et al.*, 1998). La degradación de la pared celular en las levaduras requiere de la degradación de las manoproteínas y del β -glucano.

Un importante candidato a blanco de la acción de la zimoliasa son las proteínas GIP, las cuales, aunque son componentes esenciales de la pared celular, también están presentes en la membrana plasmática (ver sección 1.7 en Introducción). Las proteínas GIP son proteínas glicosilfosfatidilinositol (GPI)-Ccwps, las cuales están unidas al β -1,6-glucano de la pared celular a través de una forma procesada del "ancla" GPI (Kollar *et al.*, 1997). Los estudios han demostrado que estas proteínas son liberadas de la membrana plasmática a la pared celular durante la formación de la última; este hecho implica que, mientras las proteínas (GPI)-Ccwps están en espera de ser transferidas a la pared celular, forman parte importante de la membrana plasmática de la levadura, y pensamos que, dado que la formación de la pared celular se encuentra activa en células de fase exponencial, como es el caso del presente trabajo, la cantidad de proteínas (GPI)-Ccwps presentes en la membrana plasmática al momento del tratamiento con zimoliasa, debe ser muy alta.

En el paso de transferencia de la membrana plasmática a la pared celular, el ancla GPI es cortado y los grupos glucosaminil y fosfatidilinositol se pierden (Kollar *et al.*, 1997). Tres de las principales manoproteínas contenidas en la pared celular son las proteínas Cwp1p, Cwp2p y Tip1p (van der Vaart *et al.*, 1995). Debido a la presencia de enlaces β -

glucosídicos en dichas proteínas, la zimoliasa podría romperlos, aún cuando estas proteínas se encontraran ancladas en la membrana plasmática. Lo anterior podría provocar importantes alteraciones en la permeabilidad de dicha membrana. Se requieren más estudios para conocer si efectivamente dicho mecanismo es importante en la permeabilización de la membrana plasmática y conocer la forma en que la zimoliasa actúa sobre la misma.

Por otra parte, en nuestro trabajo ninguna de las dos cepas utilizadas (La Azteca y BY4742) requirieron del tratamiento con un agente permeabilizante de la membrana plasmática, pero es probable que la respuesta de otras cepas a la zimoliasa sea distinta. Existen diferentes factores que influyen sobre la actividad de la zimoliasa, a saber: a) la temperatura, el pH y la concentración de enzima, b) la cepa y las variaciones de especie, c) el daño químico ocasionado sobre la pared celular, d) la modificación de genes esenciales de la pared celular lo cual cambia la velocidad de lisis (Ovalle *et al.*, 1998) y, e) la fase de crecimiento en que las células se someten a la acción de la enzima.

Otra característica sobresaliente es que, a bajas concentraciones de zimoliasa, los parámetros de la curva de lisis dependen de la concentración de proteasa presente en la zimoliasa (Ovalle *et al.*, 1998). Por lo tanto, si se desea aplicar la técnica de estudio *in situ* del transporte vacuolar en estas cepas, será indispensable realizar una evaluación previa acerca del efecto de agentes permeabilizantes como la nistatina sobre la permeabilidad, tanto de la membrana plasmática como de los organelos internos de dichas levaduras.

La nistatina es un agente antifúngico descrito desde hace varias décadas como permeabilizante celular, y por lo tanto afecta el crecimiento y el metabolismo de las levaduras. Entre otros componentes celulares, la nistatina provoca la pérdida de ácidos del ciclo de Krebs, fosfato inorgánico y potasio intracelular (Sutton *et al.*, 1961). En vista de la distinta composición de las membranas plasmática y vacuolar y, de manera particular, la baja cantidad de ergosterol presente en esta última, en teoría es posible permeabilizar la membrana plasmática con nistatina sin afectar a la vacuola y de esta forma llevar a cabo estudios *in situ* de este organelo (Schwencke y de Robichon-Szulmajster, 1976; De Kruijff y Demel, 1974). Por estas razones se recomienda como primera opción la aplicación de dicho compuesto para tales fines. La condición indispensable es que sólo se altere la

permeabilidad de la membrana plasmática, sin alterar la integridad de los organelos internos. Para lograr lo anterior, sería necesario hacer ensayos con distintas concentraciones y distintos tiempos de incubación con dicho agente permeabilizante hasta lograr las condiciones adecuadas.

4.3. CONSUMO DE OXÍGENO EN LEVADURAS Y ESFEROPLASTOS

La respiración mitocondrial en esferoplastos confirmó la permeabilidad de la membrana plasmática así como la integridad de la mitocondria. Se utilizaron cuatro sustratos para evaluar dicha permeabilidad. En las levaduras cultivadas en medio con lactato se estimula la actividad del transportador Jen1p, para lactato (Casal *et al.*, 1995) y piruvato (De Hertogh *et al.*, 2002). Ambos sustratos atravesaron la membrana plasmática de la levadura y estimularon la respiración (lactato 17.1% y piruvato 42%, Tabla 3), pero la respuesta de los esferoplastos fue significativamente mayor con y sin ADP, que en las levaduras intactas (lactato 113% y 432%; piruvato 69% y 286%, con y sin ADP respectivamente, Tabla 2). Lo anterior demostró la permeabilidad de la membrana plasmática de los esferoplastos.

El etanol es libremente permeable a través de las membranas celulares y es convertido a acetaldehído en el citosol por la alcohol deshidrogenasa 2 (Adh2p) (Thomson *et al.*, 2005). Posteriormente, se transforma en acetato y acetyl Co-A, la cual entra al ciclo de Krebs (Thomson *et al.*, 2005). La libre entrada del etanol a través de la membrana plasmática de la levadura provocó que con este sustrato el porcentaje de estimulación de la respiración en las células intactas (36.7%, Tabla 3) fuera muy similar al correspondiente a los esferoplastos sin ADP (46%, Tabla 2). Sin embargo, en estos últimos, la respiración se estimula considerablemente en presencia de ADP (161%, Tabla 2), demostrando la permeabilidad de los esferoplastos al ADP, lo cual no se observó en levaduras (no se muestra).

La glucosa se transporta a través de varios transportadores en la levadura (Hxt1-4, Hxt6 y Hxt7) (Elbing *et al.*, 2004). Pero, en virtud de la permeabilidad de los esferoplastos, el porcentaje de estimulación de la respiración en los esferoplastos con y sin ADP (Tabla 2)

fue significativamente mayor que en las levaduras (Tabla 3) (61% y 218% *vs* 15.4%). Aún así, es importante recalcar que la respiración de la glucosa en esferoplastos fue posible solamente en presencia de cofactores de la glucólisis como ATP y ADP. Esto es un indicio de la salida de compuestos de los esferoplastos y el abatimiento de la glucólisis en los mismos. De hecho, estudios realizados por Sutton *et al.* (1961) en levaduras permeabilizadas con nistatina, demostraron la salida de dichos cofactores, y lograron reconstituir la fermentación añadiéndolos nuevamente al medio.

El ensayo de producción de NADH (Peña *et al.*, 1967) en los esferoplastos resultó ser un ensayo útil en la valoración de su capacidad glucolítica. Los resultados confirmaron nuevamente la disminución de la capacidad glucolítica de los esferoplastos permeables, debido probablemente a la salida de cofactores al medio.

4.4. LA PERMEABILIDAD DE LOS ESFEROPLASTOS

Hay diversas formas de seguir la permeabilización celular entre las que destacan: la medida de material que absorbe a 260 nm (Ohsumi *et al.*, 1988; Huber-Wälchli y Wiemken, 1979), el flujo de aminoácidos citosólicos (Ohsumi *et al.*, 1988) y de ATP (Förster *et al.*, 1998). También, el seguimiento de la actividad de enzimas citosólicas como β -galactosidasa (Joshi *et al.*, 1987), hexocinasa, malato deshidrogenasa y otras (Serrano *et al.*, 1973). Nosotros elegimos seguir la liberación de nucleótidos y la actividad de la glucosa 6-fosfato deshidrogenasa como indicadores de la permeabilidad de los esferoplastos. Observamos que conforme se forman los esferoplastos en la incubación con zimoliasa, se liberan al medio nucleótidos y proteínas, y puede detectarse la actividad de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa con substratos externos. Lo anterior demostró que el tratamiento de las levaduras con zimoliasa, produjo esferoplastos permeables.

La permeabilidad de la membrana también fue evaluada mediante la adición de la cianina DiSC₃(3), que permite estimar el $\Delta\psi$ de la membrana plasmática (Peña *et al.*, 1984). Es importante hacer hincapié en la homogeneidad de la preparación de esferoplastos; la ausencia de respuesta del $\Delta\psi$ a iones potasio demostró la ausencia de esferoplastos con membrana plasmática íntegra, ya que si así fuera el ion potasio provocaría la

despolarización de la membrana plasmática. Además, la fluorescencia de la cianina en presencia o ausencia de glucosa presentó un valor muy similar (no se muestra), lo que demostró la ausencia de $\Delta\psi$ en la membrana plasmática. En vista de la permeabilidad membranal, y a pesar de la alta actividad de la H^+ -ATPasa plasmática, en presencia de glucosa no se establece el $\Delta\psi$ en la membrana plasmática de los esferoplastos (no se muestra).

4.5. APLICACIÓN AL ESTUDIO *in situ* DEL TRANSPORTE VACUOLAR Y OTROS

La mayor parte de los estudios en torno al transporte a través de la membrana vacuolar en la levadura se han realizados en vesículas vacuolares (Ohsumi y Anraku, 1981; Sato *et al.*, 1984). Nuestro trabajo ofrece una nueva alternativa para llevarlo a cabo *in situ*. Esta técnica ofrece algunas ventajas sobre el de las vesículas vacuolares: a) el modelo ofrece rapidez y comodidad para estudiar la vacuola, b) los esferoplastos permeables pueden marcarse con colorantes que permiten el seguimiento del ΔpH y $\Delta\psi$ de membrana vacuolar, c) también es posible estudiar el transporte del potasio a la vacuola y cuantificar la actividad de las H^+ -ATPasas plasmática y vacuolar, d) permiten la cuantificación del potasio vacuolar, y aunque en este trabajo no se realizó, restando el potasio vacuolar al potasio total en levaduras, es posible cuantificar el potasio citoplásmico y, e) gracias a que se mantiene la integridad de los organelos internos, es posible llevar a cabo mediciones de respiración mitocondrial.

4.6. POTASIO INTERNO

Una aplicación importante de este ensayo fue el estudio de los cambios del contenido de potasio interno en levaduras sometidas a distintas condiciones de crecimiento o incubación. En vista de que la vacuola es el organelo que contiene una mayor concentración de potasio (Okorokov *et al.*, 1980), consideramos que el potasio contenido en los esferoplastos permeables es de origen mayoritariamente vacuolar, aunque no se

puede descartar que una pequeña parte provenga de la mitocondria, que también contiene un antiportador K^+/H^+ en su membrana externa (Froschauer *et al.*, 2005).

El estudio de la dinámica del potasio, su almacenamiento en la vacuola y su liberación hacia el citosol ofrecen una visión más clara del papel de la vacuola en la homeostasis iónica de la levadura, así como de la regulación de las concentraciones de este catión en la célula. Dichos estudios podrían a su vez ser aplicados al transporte de otros iones para los cuales se han descrito mecanismos de transporte vacuolar. Tal es el caso de los iones tóxicos como el Fe^{2+} , el Cu^{2+} y otros (Corson *et al.*, 1999).

El interés en torno a los mecanismos de tolerancia al estrés salino en la levadura se remonta a tiempo atrás (Norkrans y Kylin, 1969), el cual, a últimas fechas, se ha incrementado considerablemente (Wadskog y Adler, 2003). Se ha mencionado que un mecanismo importante que incrementaría la halotolerancia en las levaduras es el almacenamiento de iones en los compartimentos internos (Nass y Rao, 1997). El estudio de la dinámica del Na^+ en levaduras cultivadas bajo distintas condiciones, y específicamente, del papel de la vacuola en dicho almacenamiento, daría más luz en torno al fenómeno de tolerancia al estrés salino.

4.7. ACTIVIDAD DE ATPasas

Siendo las H^+ -ATPasas plasmática y vacuolar las enzimas responsables de la creación del ΔpH y del $\Delta\psi$ en las membranas plasmática y vacuolar respectivamente, la cuantificación de su actividad representa un ensayo fundamental para comprender los procesos de transporte en la levadura. Este ensayo fue posible gracias a la aplicación de inhibidores específicos para cada una de ellas.

Los resultados mostraron una alta actividad de la H^+ -ATPasa plasmática. Esta es una enzima fundamental para la vida y desarrollo de la levadura, y el sistema de mayor consumo de ATP en la levadura (Serrano, 1980). Su importancia radica en que en virtud del ΔpH y el $\Delta\psi$ que dicha enzima establece en la membrana plasmática, múltiples transportadores secundarios pueden llevar a cabo su función (Kotyk, 1994). En virtud de

que es posible detectar su actividad en esferoplastos permeabilizados, se abre la oportunidad de continuar el estudio de la actividad de esta enzima en levaduras incubadas bajo distintas condiciones como la presencia de sales o en mutantes de la V-ATPasa vacuolar (Kane, 1995).

La detección de la actividad de la V-ATPasa permitió el diseño de los ensayos de $\Delta\Psi$ y ΔpH en la vacuola en los esferoplastos. Sin embargo, el modelo de esferoplastos permeables también abre la oportunidad de llevar a cabo otro tipo de estudios *in situ* de esta enzima en levaduras cultivadas bajo distintas condiciones. En el laboratorio se está diseñando un nuevo proyecto que involucra la producción de esferoplastos de mutantes de la V-ATPasa en la cual se desea estudiar el mecanismo de ensamble de dicha enzima (Kane, 1995). Asimismo, esta enzima pareciera jugar un papel importante en la tolerancia a NaCl en levaduras (Hamilton *et al.*, 2002); asimismo, en células vegetales se ha observado un incremento en la expresión de la V-ATPasa expuestas a estrés salino (Lehr *et al.*, 1999). En vista de que el modelo de esferoplastos permeables permite el seguimiento de la actividad de la V-ATPasa, así como la cuantificación del potasio vacuolar, éstos podrían ser utilizados en estudios de tolerancia al estrés salino. Consideramos que los estudios *in situ* favorecen la obtención de una visión más global de los mecanismos bioquímicos y fisiológicos de la célula. Su aplicación al estudio de la V-ATPasa bajo las condiciones arriba descritas, significaría un avance importante para el entendimiento del papel de vacuola en la homeostasis iónica y en la regulación el pH interno de la levadura.

4.8. pH VACUOLAR

El pH vacuolar se ha cuantificado mediante diversas técnicas, como la resonancia magnética nuclear del ^{31}P (Yang *et al.*, 1993) o de ^{15}N (Legerton *et al.*, 1983), la 6-carboxifluoresceína (Preston *et al.*, 1989) o su derivado BCECF (2', 7'-bis (carboxietil)-5(6)-carboxifluoresceína) (Ali *et al.*, 2004; Brett *et al.*, 2005b) y el naranja de acridina (Palmgren, 1991). Sin embargo, la técnica desarrollada por Peña *et al.* (1995), ha demostrado tener varias ventajas por sobre las otras, ya que permite la medida del pH citoplásmico y vacuolar en la levadura.

La piranina es un colorante importante porque además puede ser introducida en la vacuola aislada o en esferoplastos, lo cual amplía su aplicación. En los esferoplastos y en las vacuolas aisladas, su entrada parece depender del gradiente eléctrico, debido a su carga negativa, dada por tres grupos sulfónicos que se encuentran ionizados en todo el intervalo de pH (Kano y Fendler, 1978). Por otra parte, su grupo oxhidrilo tiene un $pK_a = 7.2$ del cual depende su equilibrio ácido-base al pH fisiológico (Clement y Gould, 1981). Nuestros resultados muestran que la entrada de la piranina a la vacuola depende del gradiente de protones a través de la membrana vacuolar; es probable que sea transportada a través de un transportador inespecífico para aniones. Algunos de los transportadores aniónicos más estudiados son el transportador de fosfatos (Booth y Guidotti, 1997) y de sulfatos (Hirata *et al.*, 2002) así como el canal de Cl^- (Anraku *et al.*, 1989). Más estudios se requieren para conocer el mecanismo de transporte de la piranina en la vacuola.

El hecho de que la piranina también es almacenada en vacuolas aisladas permitirá el desarrollo de más estudios en torno a este organelo. Es importante que, dada la versatilidad de dicha técnica, nos ha permitido comparar la respuesta del pH vacuolar de levaduras completas y de esferoplastos o de vacuolas aisladas; dichos estudios podrán dar más luz acerca del transporte vacuolar y del papel de la vacuola en la regulación del pH interno de la levadura.

4.9. EL TRANSPORTE DE K^+ A LA VACUOLA

El ensayo del transporte de potasio en los esferoplastos permeables es importante porque permite estudiar *in situ* el transporte vacuolar del potasio, independientemente de la membrana plasmática. Estos ensayos se han realizado en levaduras permeabilizadas con $CuCl_2$ (Ohsumi *et al.*, 1988; Keenan y Weiss, 1997) y DEAE-dextran (Huber-Wälchli, and Wiemken, 1979; Theuvenet *et al.*, 1986) así como de otros cationes como el Ca^{2+} en *C. parapsilosis*, pero no con el detalle presentado en este trabajo.

Un dato adicional es el efecto del derivado de la amilorida (5-[N,N,hexametilenamidorida) sobre el flujo del potasio vacuolar. La amilorida es un inhibidor frecuentemente utilizado en la caracterización de los antiportadores Na^+/H^+

(Kleyman y Cragoe, 1988). Se sabe que los antiportadores Na^+/H^+ presentes en la membrana plasmática son muy sensibles a este compuesto pero los que se localizan en compartimentos intracelulares son menos sensibles (Nass y Rao, 1998). Nuestros estudios indican que existe un transportador de potasio vacuolar sensible a este inhibidor ya que a muy bajas concentraciones ($5 \mu\text{M}$) provocó la liberación masiva de este catión. Sin embargo, se requieren más estudios al respecto para la completa caracterización del efecto de la amilorida sobre el transporte de potasio en la vacuola.

Por otra parte, se ha reportado la existencia de diversos grupos de antiportadores de especificidad variable. En el caso de la membrana plasmática, Kinclová *et al.* (2002) han descrito dos grupos de antiportadores de cationes de metales-alcalinos/ H^+ en la levadura. El primero presenta mayor capacidad de transporte para Li^+ y Na^+ pero no reconocen K^+ ni Rb^+ como sustratos. El segundo grupo es inespecífico para los cuatro cationes empleados (Na^+ , Li^+ , K^+ y Rb^+).

En transporte vacuolar de K^+ a) es inespecífico y, b) requiere de una alta concentración de cationes. El antiportador Na^+/H^+ descrito por Hirata *et al.* (2002) en vesículas vacuolares de *S. cerevisiae*, es capaz de transportar varios cationes pero presenta mayor selectividad para K^+ y Na^+ , aunque en dicho reporte no se puede distinguir el grado de selectividad para los otros cationes.

Nuestros resultados en torno al transporte de K^+ a la vacuola, presentan un comportamiento semejante al transporte de aminoácidos en la membrana vacuolar (Ohsumi y Anraku, 1981; Sato *et al.*, 1984), ya que en ambos casos se requieren de altas concentraciones de aminoácidos para ser almacenados en la vacuola. Se ha observado que los transportadores de la vacuola presentan una menor afinidad por sus sustratos: los valores de K_m son del orden de 10^{-3} M, que son mayores en uno a dos órdenes de magnitud con respecto a los transportadores de la membrana plasmática (Sato *et al.*, 1984). Este fenómeno coincide con el papel de almacenamiento que tiene la vacuola, la cual parece requerir altas concentraciones citosólicas para el almacenamiento de los iones u otros materiales en este compartimento.

También se encontró que la inclusión de la piranina en las vacuolas puede aplicarse al estudio del transporte de otros compuestos como el Ca^{2+} y los aminoácidos. En el caso del Ca^{2+} también se observó la alcalinización vacuolar con $50 \mu\text{M}$ de este catión (no se muestran), lo cual coincide con la presencia del antiportador $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ reportado por Ohsumi y Anraku (1983). Los estudios realizados mostraron que la adición de aminoácidos básicos a los esferoplastos (Lys, Arg) causó la alcalinización vacuolar con el mismo orden de especificidad que para la acumulación de los distintos aminoácidos en este organelo. La vacuola es capaz de transportar con mayor eficiencia aminoácidos básicos como la histidina, la arginina pero otros, como la treonina y la glicina, se transportan muy lentamente o no se transportan. Este hecho amplía las posibilidades de la presente técnica a otros estudios (Sato *et al.*, 1984).

4.10. LA VACUOLA Y SU PAPEL EN LA REGULACIÓN DEL PH INTERNO DE LA LEVADURA

Los resultados obtenidos en los esferoplastos y en vacuolas aisladas sugieren la existencia de un antiportador K^+/H^+ en la vacuola, aunque el patrón de alcalinización vacuolar fue muy distinto entre las levaduras (Calahorra *et al.*, 1998) y los esferoplastos o vacuolas aisladas. La respuesta de la vacuola en las levaduras intactas siguió un patrón de cambios muy similar al del pH citoplásmico, ante la adición de los distintos cationes monovalentes. En el organelo aislado o en los esferoplastos, no hay gran selectividad, lo cual tal vez se deba a que la vacuola debe manejar los cationes que ya se han acumulado en el interior de la célula.

Por otra parte, los estudios del pH vacuolar en la levadura intacta demostraron que este organelo sigue, de manera paralela, cambios de pH similares a los cambios del pH citoplásmico. Este fenómeno la convierte en una especie de reservorio de protones destinado a la regulación del pH del citoplasma, el cual, en vista del tamaño de este organelo en la levadura, sería de gran importancia. En vista del importante papel que se le ha atribuido a la vacuola tanto en la homeostasis iónica como en la regulación del pH interno de la levadura (Klionsky *et al.*, 1990), una parte de los protones que la vacuola

contiene en su interior, serían liberados al citoplasma como respuesta a los cambios del pH citoplásmico. Este fenómeno evitaría una excesiva alcalinización del citoplasma y al mantenimiento del pH citoplásmico dentro de un intervalo fisiológico.

La pregunta es: ¿de qué manera podría comprobarse si la vacuola juega un papel en la regulación del pH interno de la levadura? Los análisis propuestos son:

- a) Al variar la capacidad de transporte del ion potasio a través de la membrana plasmática, se debería también alterar la respuesta vacuolar (por ejemplo en mutantes $\Delta trk1 \Delta trk2$).
- b) Estudiando la respuesta de la vacuola tras la alcalinización citoplásmica con compuestos diferentes al ion potasio. Se podría observar si la respuesta vacuolar es específica para la entrada del ion potasio o a la alcalinización citoplásmica en general.
- c) Observando la respuesta de otras cepas diferentes a La Azteca; en el caso de la cepa BY4742, los cambios del pH citoplásmico y de la vacuola son menores.
- d) Por otra parte, sería importante estudiar el transportador involucrado en la liberación de acidez vacuolar y que estaría jugando un importante papel en la regulación del pH interno de la levadura.

4.11. TRANSPORTE DE K^+ A LA VACUOLA DE MUTANTES $\Delta nhx1$

Los resultados mostraron que $Nhx1p$ no es la proteína encargada de transportar potasio a la vacuola de *S. cerevisiae*, ya que no se observó alteración alguna en este proceso en las mutantes $\Delta nhx1$ con respecto a la cepa silvestre. Nuestros resultados son similares a los de Hirata *et al.* (2002), quien encontró que dichas mutantes $\Delta nhx1$ continúan transportando Na^+ en vesículas vacuolares de *S. cerevisiae*. Es por lo tanto probable que el transportador propuesto por Hirata *et al.* (2002) y el caracterizado en el presente trabajo sean la misma proteína.

Nuestros datos apuntan hacia la existencia de un antiportador K^+/H^+ en la vacuola; sin embargo, no será hasta que se identifique a una sola proteína como la responsable de ambos flujos para la entrada simultánea de K^+ y H^+ , que podrá decirse con toda certeza que existe un antiportador de esta naturaleza.

Brett *et al.* (2005a) hacen un recuento exhaustivo de las secuencias homólogas de los diferentes antiportadores Na^+/H^+ presentes en diversos tipos celulares, así como de su relación filogenética. Sin embargo, no se ha descrito ningún candidato para el antiportador K^+/H^+ vacuolar, por lo que es posible que se trate de una proteína distinta a las descritas hasta la fecha. Aparentemente no se ha dado la importancia necesaria al transporte del ion potasio a la vacuola de levaduras y es probable que esta sea una causa importante por la que no se ha descrito ningún candidato. La situación al respecto es muy diferente en el caso de la vacuola de plantas en la que se han realizado extensos estudios en torno a la vacuola y el tonoplasto así como al desarrollo, a últimas fechas, del proteoma de la vacuola vegetal (Shimaoka *et al.*, 2004). Se requieren estudios similares en la levadura, que ayuden a comprender mejor el papel del ion potasio en la misma.

5. CONCLUSIONES

1. Los estudios del ΔpH y $\Delta\psi$ a través de la membrana vacuolar sugieren la existencia de un antiportador inespecífico K^+/H^+ en la membrana vacuolar, cuya proteína responsable del flujo simultáneo de K^+ y H^+ no está identificada a la fecha. Las características más sobresalientes de este transportador son: a) la baja afinidad, que se traduce en la alta concentración de los cationes monovalentes requerida para este transporte vacuolar y, b) la inespecificidad del sistema. Dichas características son claramente diferentes a las del transporte del ion potasio en la membrana plasmática de la levadura.

2. El trabajo realizado en la mutante Δnhx1 demostró que el antiportador Nhx1p no es el responsable del transporte del ion potasio en la vacuola de la levadura. Y puesto que a la fecha no existe ningún candidato que pudiera cumplir con dicha función, más estudios de genómica y proteómica vacuolar en la levadura son requeridos con el fin de encontrar el gene y la proteína responsable de dicho transporte.

3. Los esferoplastos permeables preparados con zimoliasa presentan importantes características que favorecen el estudio *in situ* del transporte del K^+ a la vacuola de la levadura. Las características más sobresalientes son:

- a) La membrana plasmática se permeabiliza y se abate el potencial de la membrana plasmática. Al permitir el flujo de componentes citosólicos, la capacidad glucolítica de los esferoplastos decae notoriamente lo que elimina la interferencia del metabolismo sobre el estudio del transporte vacuolar.
- b) A pesar de la permeabilización de la membrana plasmática, los esferoplastos mantienen la integridad estructural y funcional de los organelos internos tales como la mitocondria y la vacuola.
- c) Estas propiedades permitieron medir, con colorantes fluorescentes, el ΔpH y $\Delta\psi$ a través de la membrana vacuolar, así como llevar a cabo la cuantificación diferencial del potasio citosólico y vacuolar en la levadura.

6. REFERENCIAS

- Ali, R., Brett, Ch.L., Mukherjee, S., and Rao, R. 2004. Inhibition of sodium/proton exchange by a Rab-GTPase-activating protein regulates endosomal traffic in yeast. *J Biol Chem* **279**:4498-4506.
- Angiolella, L., Facchin, M., Stringaro, A., Maras, B., Simonetti, N., and Cassone, A. 1996. Identification of a glucan-associated enolase as a main cell wall protein of *Candida albicans* and a indirect target of lipopeptide antimycotics. *J Infect Dis* **173**:684-690.
- Anraku, Y., Umemoto, N., Hirata, R., and Wada, Y. 1989. Structure and function of the yeast vacuolar membrane proton ATPase. *J Bioenerg Biomembr* **21**: 589-603.
- Avéret, N., Fitton, V., Bunoust, O., Rigoulet, M., and Guérin, B. 1998. Yeast mitochondrial metabolism: from *in vitro* to *in situ* quantitative study. *Mol Cell Biochem* **184**:67-79.
- Baker, G.F., and Naftalin, R.J. 1979. Evidence of multiple operational affinities for D-glucose inside the human erythrocyte membrane. *Biochim Biophys Acta* **550**:474-484.
- Bañuelos, M.A., Sychrova, H., Bleykasten-Grosshans, C., Souciet, J-L., and Potier, S. 1998. The NHA1 antiporter of *Saccharomyces cerevisiae* mediates sodium and potassium efflux. *Microbiol* **144**:2749-2758.
- Barnett, J.A. 1998. A history of research on yeast 1: work by chemist and biologist, 1789-1850. *Yeast* **14**:1439-1451.
- Barnett, J.A. 2000. A history of research on yeast 2: Louis Pasteur and his contemporaries, 1850-1880. *Yeast* **16**:755-771.
- Bihler, H., Slayman, A., and Bertl, A. 1998. NSC1: a novel high-current inward rectifier for cations in the plasma membrane of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett* **432**:59-64.
- Bihler, H., Slayman, C.L., and Bertl, A. 2002. Low-affinity potassium uptake by *Saccharomyces cerevisiae* is mediated by NSC1, a calcium-blocked non-specific cation channel. *Biochim Biophys Acta* **1558**:109-118.

- Bolard, J. 1986. How do the polyene macrolide antibiotics affect the cellular membrane properties?. *Biochim Biophys Acta* **864**:257-304.
- Booth, J.W., and Guidotti, G. 1997. Phosphate transport in yeast vacuoles. *J Biol Chem* **272**:20408-20413.
- Bordallo, C. Schwencke, J., and Suárez-Rendueles, M. 1984. Localization of the thermosensitive X-prolyl dipeptidyl aminopeptidase in the vacuolar membrane of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett* **173**:199-203.
- Borst-Pauwels, G.W.F.H. and Peters, P.H.J., 1981. Factors affecting the inhibition of yeast plasma membrane ATPase by vanadate. *Biochim Biophys Acta* **642**:173-181.
- Bottema, C.D.K., McLean-Bowen, C.A., and Parks, L.W. 1983. Role of sterol structure in the thermotropic behaviour of plasma membrane of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim Biophys Acta* **734**:235-248.
- Bowers, K., Levi, B.P., Patel, F.I., and Stevens, T.H. 2000. The sodium/proton exchanger Nhx1p is required for endosomal protein trafficking in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* **11**:4277-4294.
- Bowman, E.J. 1983. Comparison of the vacuolar membrane ATPase of *Neurospora crassa* with the mitochondrial and plasma membrane ATPases. *J Biol Chem* **258**: 15238-15244.
- Bowman, E.J., Mandala, S., Taiz, L., and Bowman, B.J. 1986. Structural studies of the vacuolar membrane ATPase from *Neurospora crassa* and comparison with the tonoplast membrane ATPase from *Zea mays*. *Proc Natl Acad Sci* **83**:48-52.
- Bowman, E.J., Graham, L.A., Stevens, T.H., and Bowman, B. J. 2004. The bafilomycin/concanamycin binding site in subunit c of the V-ATPase from *Neurospora crassa* and *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **279**:33131-33138.
- Brett, C.L., Donowitz, M., and Rao, R. 2005a. Evolutionary origins of eukaryotic sodium/proton exchangers. *Am J Physiol Cell Physiol* **288**:223-239.
- Brett, C.L., Tukaye, D.N., Mukherjee, S., and Rao, R. 2005b. The yeast endosomal Na⁺(K⁺)/H⁺ exchanger Nhx1 regulates cellular pH to control vesicle trafficking. *Mol Biol Cell* **16**:1396-1405.

- Brown, D., and Breton, S. 2000. H⁺V-ATPase-dependent luminal acidification in the kidney collecting duct and the epididymis/vas deferens: vesicle recycling and transcytotic pathways. *J Exp Biol* **203**:137-145.
- Brutyan, R.A., and McPhie, P. 1996. On the one-sided action of amphotericin B on lipid bilayer membranes. *J Gen Physiol* **107**:69-78.
- Bryant, N.J., and Stevens, T.H. 1998. Vacuole biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*: protein transport pathways to the yeast vacuole. *Microbiol Mol Biol Rev* **62**:230-247.
- Calahorra, M., Ramírez, J., Clemente, M.S., and Peña, A. 1987. Electrochemical potential and ion transport in vesicles of yeast plasma membrane. *Biochim Biophys Acta* **899**:229-238.
- Calahorra, M., Martínez, G.A., Hernández-Cruz, A., and Peña, A. 1998. Influence of monovalent cations on yeast cytoplasmic and vacuolar pH. *Yeast* **14**:501-515.
- Camarasa, C., Prieto, S., Ros, R., Salmon, J-M., and Barre, P. 1996. Evidence for selective and electroneutral K⁺/H⁺-exchange in *Saccharomyces cerevisiae* using plasma membrane vesicles. *Yeast* **12**:1301-1313.
- Cappellaro, C., Baldermann, C., Rachel, R., and Tanner, W. 1994. Mating type-specific cell-cell recognition of *Saccharomyces cerevisiae*: cell wall attachment and active sites of α - and α -agglutinin. *EMBO J* **13**: 4737-4744.
- Casal, M., Blázquez, M.A., Gamo, F.J., Gancedo, C., and Leão, C. 1995. Lack of lactate-proton symport activity in *pck1* mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Lett* **128**:279-282.
- Cass, A., Finkelstein, A., and Krespi, V. 1970. The ion permeability induced in thin lipid membranes by the polyene antibiotics nystatin and amphotericin B. *J Gen Physiol* **56**:100-124.
- Cerejido, M., Shoshani, L. and Contreras, R.G. 2001. The polarized distribution of Na⁺,K⁺-ATPase and active transport across epithelia. *J Membr Biol* **184**:299-304.
- Clement, N.R., and Gould, J.M. 1981. Pyranine (8-hydroxy-1,3,6-pyrenetrisulfonate) as a probe of internal aqueous hydrogen ion concentration in phospholipid vesicles. *Am Chem Soc* **20**:1534-1538.
- Cohen, B.E. 1992. A sequential mechanism for the formation of aqueous channels by amphotericin B in liposomes. The effect of sterols and phospholipid composition. *Biochim Biophys Acta* **1108**:49-58.

- Cohen, B.E. 1998. Amphotericin B toxicity and lethality: a tale of two channels. *Int J Pharm* **162**:95-106.
- Collander, R., Turpeinen, O., and Fabritius, E. 1931. Die permeabilität der Rhoecellen für Ammoniak und Essigsäure. *Protoplasma* **13**:348-362.
- Conway, E.J. and Downey, M. 1950. pH values of the yeast cell. *Biochem J* **47**:355-360.
- Conway, E.J., and Brady, T.G. 1950. Biological production of acid and alkali. I. Quantitative relations of succinic and carbonic acids to the potassium and hydrogen ion exchange in fermenting yeast. *Biochem J* **47**:360-369.
- Conway, E.J., and 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., and Duggan, F. 1958. A cation carrier in the yeast cell wall. *Biochem J* **69**: 265-274.
- Corson, L.B., Folmer, J., Strain, J.J., Culotta, V.C., and Cleveland, D.W. 1999. Oxidative stress and iron are implicated in fragmenting vacuoles of *Saccharomyces cerevisiae* lacking Cu,Zn-superoxide dismutase. *J Biol Chem* **274**:27590-27596.
- Counillon, L., and Pouyssegur, J. 2000. The expanding family of eucaryotic Na⁽⁺⁾/H⁽⁺⁾ exchangers. *J Biol Chem* **275**:1-4.
- Crane, R.K. 1965. Na⁺-dependent transport in the intestine and other animal tissues. *Fed Proc* **24**:1000-1006.
- Chabot, G.G., Pazdur, R., Valeriote, F.A., and Baker, H. 1989. Pharmacokinetics and toxicity of continuous infusion of amphotericin B in cancer patients. *J Pharm Sci* **78**:307-310.
- Darley, C.P., van Wuytswinkel, O.C.M., van der Woude, K., Mager, W.H., and de Boer, A.H. 2000. *Arabidopsis thaliana* and *Saccharomyces cerevisiae* NHX1 genes encode amiloride sensitive electroneutral Na⁺/H⁺ exchangers. *Biochem J* **351**:241-249.
- De Hertogh, B., Carvajal, E., Talla, E., Dujon, B., Baret, P., and Goffeau, A. 2002. Phylogenetic classification of transporters and other membrane proteins from *Saccharomyces cerevisiae*. *Funct Integr Genomics* **2**:154-170.

- De Kruijff, B., Gerritsen, A., Oerlemans, A., Demel, R.A., and van Deenen, L.L.M. 1974. Polyene antibiotic-sterol interactions in membranes of *Acholeplasma laidkawii* cells lecithin liposomes. I. Specificity of the membrane permeability changes induced by the polyene antibiotics. *Biochim Biophys Acta* **339**:30-43.
- De Kruijff, B., and Demel, R.A. 1974. Polyene antibiotic-sterol interactions in membranes of *Acholeplasma laidkawii* cells lecithin liposomes. III. Molecular structure of the polyene antibiotic-cholesterol complexes. *Biochim Biophys Acta* **339**:57-70.
- De Nobel, J.G., Klis, F.M., Priem, J., Munnik, T., and Van Den Ende, H. 1990. The glucanase-soluble mannoproteins limit cell wall porosity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **6**: 491-499.
- Dürr, M., Boyer, Th., and Wiemken, A. 1975. Polybase induced lysis of yeast spheroplasts. A new gentle method for preparation of vacuoles. *Arch Microbiol* **105**:319-327.
- Eddy, A.A., and Williamson, D.H. 1959. Formation of aberrant cell walls and of spores by the growing yeast protoplasts. *Nature* **183**:1101-1104.
- Elango, N., Correa, J.U., and Cabib, E. 1982. Secretory character of yeast chitinase. *J Biol Chem* **257**:1398-1400.
- Elbing, K., Larsson, C., Bill, R.M., Albers, E., Snoep, J.L., Boles, E., Hohmann, S., and Gustafsson, L. 2004. Role of hexose transport in control of glycolytic flux in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Environ Microbiol* **70**:5323-5330.
- Emter, O., and Wolf, D.H. 1984. Vacuoles are not the sole compartments of proteolytic enzymes in yeast. *FEBS Lett* **166**:321-325.
- Eraso, P., Martínez-Burgos, M., Falcón-Pérez, J.M., Portillo, F., and Mazón, M.J. 2004. Ycfl-dependent cadmium detoxification by yeast requires phosphorylation of residues Ser⁹⁰⁸ and Thr⁹¹¹. *FEBS Lett* **577**:322-326.
- Erez, O., and Kahana, C. 2001. Screening for modulators of spermine tolerance identifies Sky1, the SR protein kinase of *Saccharomyces cerevisiae*, as a regulator of polyamine transport and ion homeostasis. *Mol Cell Biol* **21**:175-184.
- Ernster, L., and Lee, C.P. 1964. Biological oxidoreductions. *Ann Rev Biochem* **33**:729-788.

- Eroles, P., Sentandreu, M., Elorza, M.V., and Sentandreu, R. 1997. The highly immunogenic enolase and Hsp70p are adventitious *Candida albicans* cell wall proteins. *Microbiology* **143**:313-320.
- Estrada, E., Agostinis, P., Vandenheede, J.R., Goris, J., Merlevede, W., Francois, J., Goffeau, A., and Ghislain, M. 1996. Phosphorylation of yeast plasma membrane H⁺-ATPase by casein kinase I. *J Biol Chem* **271**:32064-32072.
- Fairman, C., Zhou, X., and Kung, C. 1999. Potassium uptake through the TOK1 K⁺ channel in the budding yeast. *J Membr Biol* **168**:149-157.
- Fiske, C.A., and Subbarow, Y. 1925. The colorimetric determination of phosphorus. *J Biol Chem* **66**:375-400.
- Fleet, G.H. 1991. Cell walls. In Rose, A.H. and Harrison, J.S. (Eds), *The Yeast*, Vol. 4. Academic Press, London, pp.199-277.
- Forgac, M. 1999. Structure and properties of the vacuolar (H⁺)-ATPases. *J Biol Chem* **274**:12951-12954.
- Förster, C., Marienfeld, S., Wilhelm, R., and Krämer, R. 1998. Organelle purification and selective permeabilisation of the plasma membrane: two different approaches to study vacuoles of the filamentous fungus *Ashbya gossypii*. *FEMS Microbiol Lett* **167**:209-214.
- Fournier, I., Barwicz, J., and Tancrede, P. 1998. The structuring effects of amphotericin B on pure and ergosterol- or cholesterol- containing dipalmitoylphosphatidylcholine bilayers: a differential scanning calorimetry study. *Biochim Biophys Acta* **1373**:76-86.
- Froschauer, E., Nowikovsky, K., and Schweyen, R.J. 2005. Electroneutral K⁺/H⁺ exchange in mitochondrial membrane vesicles involves Yo1027/Letm1 proteins. *Biochim Biophys Acta* **1711**:41-48.
- Fujii, G., Chang, J.-E., Coley, T., and Steere, B. 1997. The formation of amphotericin B ion channels in lipid bilayers. *Biochem* **36**:4959-4968.
- Gaber, R.F., Styles, C.A., and Fink, G.R. 1988. TRK1 encodes a plasma membrane protein required for high-affinity potassium transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **8**:2848-2859.
- Gagos, M., Koper, R., and Gruszecki, W.I. 2001. Spectrophotometric analysis of organisation of dipalmitoylphosphatidylcholine bilayers containing the polyene antibiotic amphotericin B. *Biochim Biophys Acta* **1511**:90-98.

- Gardner, M.L., Godley, P., and Wasan, S.M. 1990. Sodium loading treatment of amphotericin B-induced nephrotoxicity. *DICP* **24**:940-945.
- Garcíadeblas, B., Rubio, F., Quintero, F.J., Bañuelos, M.A., Haro, R., and Rodríguez-Navarro, A. 1993. Differential expression of two genes encoding isoforms of the ATPase involved in sodium efflux in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Gen Genet* **236**:363-368.
- Ghaemmaghami, S., Huh, W.K., Bower, K., Howson, R.W., Belle, A., Dephoure, N., O'Shea, E.K., Weissman, J.S. 2003. Global analysis of protein expression in yeast. *Nature* **425**:737-741.
- Goosens, A., de La Fuente, N., Forment, J., Serrano, R., Portillo, F. 2000. Regulation of yeast H⁺-ATPase by protein kinases belonging to a family dedicated to activation of plasma membrane transporters. *Mol Cell Biol* **20**:7654-7661.
- Gowda, L.R., Joshi, M.S., and Bhat, S.G. 1988. *In situ* assay of intracellular enzymes of yeast (*Kluyveromyces fragilis*) by digitonin permeabilization of cell membrane. *Anal Biochem* **175**:531-536.
- Graham, L.A., Flannery, A.R., and Stevens, T.H. 2003. Structure and assembly of the yeast V-ATPase. *J Bioenerg Biomembr* **35**:301-312.
- Grendel, F. 1929. Über die Lipoidschicht der Chromocyten beim Schaf. *Biochem Z.* **214**:23-241.
- Gruszecki, W.I., Gagos, M., and Kernen, P. 2002. Polyene antibiotic amphotericin B in monomolecular layers: spectrophotometric and scanning force microscopic analysis. *FEBS Lett* **524**:92-96.
- Gryns, G. 1896. Über den Einfluss gelöster Stoffe auf die rothen Blutzellen mit den Erscheinungen der Osmose un Diffusion. *Pfluegers Arch Gesamte Physiol Menschen Tiere* **63**:86-119.
- Halachmi, D. and Eilam, Y. 1996. Elevated cytosolic free Ca²⁺ concentrations and massive Ca²⁺ accumulation within vacuoles, in yeast lacking PMR1, a homolog of Ca²⁺ ATPase. *FEBS Lett* **392**:194-200.
- Hamilton, C.A., Taylor, G.J., and Good, A.G. 2002. Vacuolar H⁺-ATPase, but not mitochondrial F₁F₀-ATPase, is required for NaCl tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol* **208**:227-232.

- Harold, F. 1986. The Vital Force: a study of bioenergetics. W.H. Freeman and Company. USA. 577 pp.
- Hartland, R.P., Vermeulen, C.A., Klis, F.M., Sietsma, J.H., and Wessels, J.G.H. 1994. The linkage of (1-3)- β -glucan to chitin during cell wall assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **10**:1591-1599.
- Hirata, T., Wada, Y. and Futai, M. 2002. Sodium and sulfate ion transport in yeast vacuoles. *J Biochem* **131**:261-265.
- Höber, R. 1936. The permeability of red blood corpuscles to organic anions. *J Cell Comp Physiol* **7**:367-391.
- Huber-Wälchli, V. and Wiemken, A. 1979. Differential extraction of soluble pools from cytosol and the vacuoles of yeast (*Candida utilis*) using DEAE-Dextran. *Arch Microbiol* **120**:141-149.
- Huh, W.K., Falvo, J.V., Gerke, L.C., Carroll, A.S., Howson, R.W., Weissman, J.S., and O'Shea, E.K. 2003. Global analysis of protein localization in budding yeast. *Nature* **425**: 686-691.
- Hutchison, H. T., and Hartwell, L.H. 1967. Macromolecule synthesis in yeast spheroplasts. *J Bacteriol* **94**:1697-1705.
- Jansen, R., and Gerstein, M. 2000. Analysis of the yeast transcriptome with structural and functional categories: characterizing highly expressed proteins. *Nucleic Acid Res* **28**:1481-1488.
- Jiménez-Rojas, F. 1997. Efecto del dietilaminoetil-dextran sobre la membrana de *Saccharomyces cerevisiae*. Tesis de Licenciatura. Escuela de Ciencias Químicas. Universidad Autónoma Benito Juárez de Oaxaca. Oaxaca.
- Joshi, M.S., Gowda, L.R., and Bhat, S.G. 1987. Permeabilization of yeast cells (*Kluyveromyces fragilis*) to lactose by cetyltrimethylammonium bromide. *Biotech Lett* **9**:549-554.
- Kakinuma, Y., Ohsumi, Y., and Anraku, Y. 1981. Properties of H⁺-translocating adenosine triphosphatase in vacuolar membrane of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **256**:10859-10863.
- Kane, P.M. 1995. Disassembly and reassembly of the yeast vacuolar H⁺-ATPase in Vivo. *J Biol Chem* **270**:17025-17032.

- Kano, K., and Fendler, J.H. 1978. Pyranine as a sensitive pH probe for liposome interiors and surfaces. pH gradients across phospholipid vesicle. *Biochim Biophys Acta* **509**:289-299.
- Keenan, K.A. and Weiss, R.L. 1997. Characterization of vacuolar arginine uptake and amino acid efflux in *Neurospora crassa* using cupric ion to permeabilized the plasma membrane. *Fungal Gen Biol* **22**:177-190.
- Ketchum, K.A., Joiner, W.J., Sellers, A.J., Kaczmarek, L.K., and Goldstein, S.A.N. 1995. A new family of outwardly rectifying potassium channel proteins with two pore domains in tandem. *Nature* **376**:690-695.
- Kinclová, O., Potier, S., and Sychrová, H. 2002. Difference in substrate specificity divides the yeast alkali-metal-cation/H⁺ antiporters into two subfamilies. *Microbiol* **148**:1225-1232.
- Kitamoto, K., Yoshizawa, K., Ohsumi, Y., and Anraku, Y. 1988. Dynamic aspect of vacuolar and cytosolic amino acid pools of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol* **170**: 2683-2686.
- Kitamura, K., Kaneko, T., and Yamamoto, Y. 1971. Lysis of viable yeast cells by enzymes of *Arthrobacter luteus*. *Arch Biochem Biophys* **145**:402-404.
- Kitamura, K., and Yamamoto, Y. 1972. Purification and properties of an enzyme, zymolyase, which lyses viable yeast cells. *Arch Biochem Biophys* **153**:403-406.
- Kleyman, T.R., and Cragoe, E.J., Jr. 1988. Amiloride and its analogs as tools in the study of ion transport. *J Membrane Biol* **105**:1-21.
- Klionsky, D.J., Herman, P.K., and Emr, S.D. 1990. The fungal vacuole: composition, function and biogenesis. *Microbiol Rev* **54**:266-292.
- Klis, F.M, Mol, P., Hellingwerf, K., and Brul, S. 2002. Dynamics of cell walls structure in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol Rev* **26**:239-256.
- Ko, C.H., and Gaber, R.F. 1991. *TRK1* and *TRK2* encode structurally related K⁺ transporters in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **125**:305-312.
- Kollar, R., Petrakova, E., Ashwell, G., Robbins, P.W., and Cabib, E. 1995. Architecture of the yeast cell wall: the linkage between chitin and $\beta(1,3)$ -glucan. *J Biol Chem* **270**: 1170-1178.
- Kollar, R., Reinhold, B.B., Petrakova, E., Yeh, H.J.C., Ashwell, G., Drgonova, J., Captein, J.C., Klis, F.M., and Cabib, E. 1997. Architecture of the yeast cell wall:

- $\beta(1,6)$ -glucan interconnects mannoproteins, $\beta(1,3)$ -glucan, and chitin. *J Biol Chem* **272**:17762-17775.
- Kotyk, A. 1994. Dependence of the kinetics of secondary active transports in yeast on H^+ -ATPase acidification. *J Membr Biol* **138**:29-35.
 - Kramer, R., Kopp, F., Niedermeyer, W., and Fuhrmann, G.F. 1978. Comparative studies of the structure and composition of the plasmalemma and the tonoplast in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim Biophys Acta* **507**:369-380.
 - Lampen, J.O., Arnow, P.M., Borowska, Z., and Laskin, A.I. 1962. Location and role of sterol at nystatin-binding sites. *J Bacteriol* **84**:1152-1160.
 - Laouar, L., Mulligan, B.J., and Lowe, K.C. 1992. Yeast permeabilization with surfactants. *Biotech Lett* **14**:719-720.
 - Lasnitski, A., and Szörényi, E. 1935. The influence of alkali cations on the fermentation capacity of yeast. *Biochem J* **29**: 580-587.
 - Legerton, T.L., Kanamori, K. Weiss, R.L., and Roberts, J.D. 1983. Measurements of cytoplasmic and vacuolar pH in *Neurospora crassa* using Nitrogen-15 nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Biochem* **22**:899-903.
 - Lehr, A., Kirsch, M., Viereck, R., Schiemann, J., and Rausch, T. 1999. cDNA and genomic cloning of sugar beet V-type H^+ -ATPase subunit A and c isoforms: evidence for coordinate expression during plant development and coordinate induction in response to high salinity. *Plant Mol Biol* **39**:463-475.
 - Li, Y.-P., Chen, W., Liang, Y., Li, E, and Stashenko, P. 1999. *Atp6i*-deficient mice exhibit severe osteopetrosis due to loss of osteoclast-mediated extracellular acidification. *Nat Gen* **23**:447-451.
 - Li, L., Chen, O.S., Mc Vey Ward, D., and Kaplan, J. 2001. CCC1 is a transporter that mediates vacuolar iron storage in yeast. *J Biol Chem* **276**:29515-29519.
 - López, R., Enriquez, E., and Peña, A. 1999. Effects of weak acids on cation accumulation, ΔpH and $\Delta \Psi$ in yeast. *Yeast* **15**:553-562.
 - MacDiarmid, C.W., Gaither, L.A., and Eide, D. 2000. Zinc transporters that regulate vacuolar zinc storage in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J* **19**:2845-2855.
 - Madrid, R., Gomez, M.J., Ramos, J., and Rodríguez-Navarro, A. 1998. Ectopic potassium uptake in *trk1 trk2* mutants of *Saccharomyces cerevisiae* correlates with a highly hyperpolarized membrane potential. *J Biol Chem* **273**:14838-14844.

- Mager, W.H., and Winderickx, J. 2005. Yeast as a model for medical and medicinal research. *Trend Pharmacol Sci* **26**:265-273.
- Magnelli, P., Cipollo, J.F., and Abeijon, C. 2002. A refined method for the determination of *Saccharomyces cerevisiae* cell wall composition and β -1,6-glucan fine structure. *Anal Biochem* **301**: 136-150.
- Manon, S., and Guérin, M. 1997. Investigation of the yeast mitochondrial unselective channel in intact and permeabilized spheroplasts. *Biochim Mol Biol Int* **44**:565-575.
- Maresova, L. and Sychrova, H. 2005. Physiological characterization of *Saccharomyces cerevisiae kha1* deletion mutants. *Mol Microbiol* **55**: 588-600.
- Martínez-Muñoz, G.A. 1999. El pH citoplásmico y vacuolar de la levadura. Tesis de Maestría. Facultad de Química. UNAM. México, D.F.
- Matile, P. 1978. Biochemistry and function of vacuoles. *Annu Rev Plant Physiol* **29**:193-213.
- Mellman, I., Fuchs, R., and Helenius, A., 1986. Acidification of the endocytic and exocytic pathways. *Annu Rev Biochem* **55**: 663-700.
- Mendoza, I., Rubio, F., Rodríguez-Navarro, A., and Pardo, J.M. 1994. The protein phosphatase calcineurin is essential for NaCl tolerance of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **269**:8792-8796.
- Milani, G., Schreiber, A., and Vercesi, A.E. 2001. Ca^{2+} transport into an intracellular acidic compartment of *Candida parapsilosis*. *FEBS Lett* **500**:80-84.
- Mitchell, P. 1961. Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemiosmotic type of mechanism. *Nature* **191**:144-148.
- Mitchell, P. 1963. Molecule, group and electron translocation through natural membranes. *Biochem Soc Symp* **22**: 142-169.
- Mitchell, P. and Boyle, J. 1967. Acid-basic titration across the membrane system of rat liver mitochondria. *Biochem J* **104**:588-600.
- Mitchell, P. 1972. Performance and conservation of osmotic work by proton-coupled solute porter systems. *Bioenerg* **4**:265-293.

- Mulet, J.M., Leube, M.P., Kron, S.J., Rios, 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 Cell Biol* **19**:3328-3337.
- Nakamura, T., Liu, Y., Hirata, D., Namba, H., Harada, S., Hirokawa, T. and Miyakawa, T. 1993. Protein phosphatase type 2B (calcineurin)-mediated, FK506-sensitive regulation of intracellular ions in yeast is an important determinant for adaptation to high salt stress conditions. *EMBO J* **12**:4063-4071.
- Nanda, A., Brumal, J.H., Nordström, T., Kjeldsen, L. Sengelov, H., Borregaard, N., Rotstein, O.D., and Grinstein, S. 1996. Activation of proton pumping in human neutrophils occurs by exocytosis of vesicles bearing vacuolar-type H⁺-ATPases. *J Biol Chem* **271**: 15963-15970.
- Nass, R., Cunningham, K.W., and Rao, R. 1997. Intracellular sequestration of sodium by a novel Na⁺/H⁺ exchanger in yeast is enhanced by mutations in the plasma membrane H⁺-ATPase. Insights into mechanisms of sodium tolerance. *J Biol Chem* **272**:26145-26152.
- Nass, R., and Rao, R. 1998. Novel localization of a Na⁺/H⁺ exchanger in a late endosomal compartment of yeast. Implications for vacuole biogenesis. *J Biol Chem* **273**:21054-21060.
- Nishi, T., and Forgac, M. 2002. The vacuolar (H⁺)-ATPases- nature's most versatile proton pumps. *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**:94-103.
- Ng, A.W.K., and Wasan, K.M. 2003. Development of liposomal polyene antibiotics: an historical perspective. *J Pharm Pharmaceut Sci* **6**:67-83.
- Norkrans, B., and Kylin, A. 1969. Regulation of the potassium to sodium ratio and of the osmotic potential in relation to salt tolerance in yeast. *J Bacteriol* **100**:836-845.
- Noubhani, A., Bunoust, O., Rigoulet, M., and Thevelein, J.M. 2000. Reconstitution of the ethanolic fermentation in permeabilized spheroplasts of wild-type and trehalose-6-phosphate synthase mutants of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur J Biochem* **267**:4566-4576.
- Ohsumi, Y., and Anraku, Y. 1981. Active transport of basic amino acids driven by a proton motive force in vacuolar membrane vesicles of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **256**:2079-2082.

- Ohsumi, Y., and Anraku, Y. 1983. Calcium transport driven by a proton motive force in vacuolar membrane vesicles of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **258**:5614-5617
- Ohsumi Y., Kitamoto, K., and Anraku, Y. 1988. Changes induced in the permeability barrier of the yeast plasma membrane by cupric ion. *J Bacteriol* **170**:2676-2682.
- Okorokov, L.A., Lichko, L.P., and Kulaev, I.S. 1980. Vacuoles: main compartments of potassium, magnesium, and phosphate ions in *Saccharomyces carlsbergensis* cells. *J Bacteriol* **144**:661-665.
- Okorokov, L.A., Kulakovskaya, T.V., and Kulaev, I.S. 1982. Solubilization and partial purification of vacuolar ATPase of yeast *Saccharomyces carlsbergensis*. *FEBS Lett* **145**:160-162.
- Opheim, D.J. 1978. α -D-mannosidase of *Saccharomyces cerevisiae* characterization and modulation of activity. *Biochim Biophys Acta* **524**:121-130.
- Orłowski, J., Kandasamy, R.A., and Shull, G.E. 1992. Molecular cloning of putative members of the Na/H exchanger gene family. cDNA cloning, deduced amino acid sequence, and mRNA tissue expression of the rat Na/H exchanger NHE-1 and two structurally related proteins. *J Biol Chem* **267**:9331-9339.
- Ovalle, R., Lim, S.T., Holder, B., Jue, C.K., Wood-Moore, C., and Lipke, P.N. 1998. A spheroplasts rate assay for determination of cell wall integrity in yeast. *Yeast* **14**:1159-1166.
- Packeiser, A.N., Urakov, V.N., Polyakova, Y.A., Shimanova, N.I., Shcherbukhin, V.D., Smirnov, V.N., and Ter-Avanesyan, M.D. 1999. A novel vacuolar protein encoded by *SSU21/MCD4* is involved in cell wall integrity in yeast. *Yeast* **15**:1485-1501.
- Palmer, Ch.P., Zhou, X-L., Lin, J., Loukin, S.H., Kung, C., and Saimi, Y. 2001. A TRP homolog in *Saccharomyces cerevisiae* forms an intracellular Ca^{2+} -permeable channel in the yeast vacuolar membrane. *Proc Natl Acad Sci* **98**:7801-7805.
- Palmgren, M.G. 1991. Acridine orange as a probe for measuring pH gradients across membranes: mechanism and limitations. *Anal Biochem* **192**:316-321.
- Pardo, M., Monteoliva, L., Pla, J., Sánchez, M., Gil, C., and Nombela, C. 1999. Two-Dimensional analysis of proteins secreted by *Saccharomyces cerevisiae* regenerating protoplasts: a novel approach to study the cell wall. *Yeast* **15**:459-472.

- Peña, A., Cinco, G., García, A., Gómez Poyou, A., and Tuena, M. 1967. Effects of externally added sodium and potassium ions on the glycolytic sequence of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim Biophys Acta* **148**:673-682.
- Peña, A., Cinco, G., Gómez-Poyou, A. and Tuena, M. 1969. Studies on the mechanism of the stimulation of glycolysis and respiration by K^+ in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim Biophys Acta* **180**:1-8.
- Peña, A., Cinco, G., Gómez-Poyou, A., and Tuena, M. 1972. Effect of the pH of the incubation medium on glycolysis and respiration in *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch Biochem Biophys* **153**:413-425.
- Peña, A. 1973. Studies with guanidines on the mechanism of K^+ transport in yeast. *FEBS Lett* **34**:117-119.
- Peña, A. 1975. Studies on the mechanism of K^+ transport in yeast. *Arch Biochem Biophys* **167**:397-407.
- Peña, A., Uribe, S., Pardo, J.P., and Borbolla, M. 1984. The use of a cyanine dye in measuring membrane potential in yeast. *Arch Biochem Biophys* **231**:217-225.
- Peña, A., Ramírez, J., Rosas, G., and Calahorra, M. 1995. Proton pumping and the internal pH of yeast cells, measured with pyranine introduced by electroporation. *J Bacteriol* **177**:1017-1022.
- Peterson, G.L. 1977. A simplification of the protein assay method of Lowry *et al* which is more generally applicable. *Anal Biochem* **83**:346-356.
- Pittman, J.K., Cheng, N-H., Shigaki, T., Kunta, M., and Hirschi, K.D. 2004. Functional dependence on calcineurin by variants of the *Saccharomyces cerevisiae* vacuolar Ca^{2+}/H^+ exchanger Vcx1p. *Mol Microbiol* **54**:1104-1116.
- Powell B., Graham, L.A., and Stevens, T.H. 2000. Molecular Characterization of the yeast vacuolar H^+ -ATPase proton pore. *J Biol Chem* **275**:23654-23660.
- Preston, R.A., Murphy, R.F., and Jones, E.W. 1989. Assay of vacuolar pH in yeast and identification of acidification-defective mutants. *Proc Natl Acad Sci* **86**:7027-7031.
- Proft, M. and Struhl, K. 2004. MAP kinase-mediated stress relief that precedes and regulates the timing of transcriptional induction. *Cell* **118**:351-361.
- Pulver, F. and Verzar, F. 1940. Connection between carbohydrate metabolism and K^+ metabolism in yeast. *Nature* **145**: 823-825.

- Ramírez, J., Peña, A., and Montero, M. 1996. H⁺/K⁺ exchange in reconstituted yeast plasma membrane vesicles. *Biochim Biophys Acta* **1285**: 175-182.
- Ramírez, J., Ramírez, O., Saldaña, C., Coria, R., and Peña, A. 1998. A *Saccharomyces cerevisiae* mutant lacking a K⁺/H⁺ exchanger. *J Bacteriol* **180**:5860-5865.
- Roberts, C.J., Pohling, G., Rothman, J.H., and Stevens, T. 1989. Structure, biosynthesis, and localization of dipeptidyl aminopeptidase B, an integral membrane glycoprotein of the yeast vacuole. *J Cell Biol* **108**:1363-1373.
- Rodríguez-Navarro, A., and Ramos, J. 1984. Dual system for potassium transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol* **159**:940-945.
- 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. and Bruce, M. 1958. The potassium efflux and influx in yeast at different potassium concentrations. *J Cell Comp Physiol* **51**:145-159.
- Roomans, G.M., and Seveus, L.A. 1976. Subcellular localization of diffusible ions in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: quantitative microprobe analysis of thin freeze-dried sections. *J Cell Sci* **21**:119-127.
- Russnak, R., Konczal, D., and McIntire, S. 2001. A family of yeast proteins mediating bi-directional vacuolar amino acid transport. *J Biol Chem* **276**:23849-23857.
- Sato, T., Ohsumi, Y., and Anraku, Y. 1984. Substrate specificities of active transport systems for amino acids in vacuolar-membrane vesicles of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **259**:11505-11508.
- Scherrer, R., Loudon, R.L., and Gerhardt, P. 1974. Porosity of the yeast cell wall and membrane. *J Bacteriol* **118**:534-540.
- Schlenk, F., Dainko, J.L., and Svihla, G. 1970. The accumulation and intracellular distribution of biological sulfonium compounds in yeast. *Arch Biochem Biophys* **140**: 228-236.
- Schwencke, J., and de Robichon-Szulmajster, H. 1976. The transport of *S*-adenosyl-methionine in isolated yeast vacuoles and spheroplasts. *Eur J Biochem* **65**:49-60.

- Schwencke, J., Canut, H., and Flores, A. 1983. Simultaneous isolation of the yeast cytosol and well-preserved mitochondria with negligible contamination by vacuolar proteinases. *FEBS Lett* **156**:274-280.
- Schwencke, J. 1991. Vacuoles, internal membranous systems and vesicles. In *The Yeast* Vol. 4, Cap. 8, 2nd edition.
- Serrano, R., Gancedo, J., and Gancedo, C. 1973. Assay of yeast enzymes *in situ*. A potential tool in regulation studies. *Eur J Biochem* **34**:479-482.
- Serrano, R. 1980. Effect of ATPase inhibitors on the proton pump of respiratory-deficient yeast. *Eur J Biochem* **105**:419-424.
- Serrano, R., Kielland-Brandt, M.C., and Fink, G.R. 1986. Yeast plasma membrane ATPase is essential for growth and has homology with (Na⁺+K⁺), K⁺ and Ca²⁺ ATPase. *Nature* **319**: 689-693.
- Serrano, R. 1991. Transport across yeast vacuolar and plasma membranes. In *The Molecular and Cellular Biology of the yeast Saccharomyces*: Genome Dynamics, Protein Synthesis and Energetics. Vol. 1 p.523. Cold Spring Harbor Lab. Press.
- Shao, E., and Forgac, M. 2004. Involvement of the nonhomologous region of subunit A of the yeast V-ATPase in coupling and *in vivo* dissociation. *J Biol Chem* **279**:48663-48670.
- Shimaoka, T., Ohnishi, M., Sazuka, T., Mitsuhashi, N., Hara-Nishimura, I., Shimazaki, K-I., Maeshima, M., Yokota, A., Tomizawa, K-I., and Tetsuro, M. 2004. Isolation of intact vacuoles and proteomic analysis of tonoplasts from suspension-cultured cells of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol* **45**:672-683.
- Shimazu, M., Sekito, T., Akiyama, K., Ohsumi, Y., and Kakinuma, Y. 2005. A family of basic amino acid transporters of the vacuolar membrane from *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **280**:4851-4857.
- Shimizu, J., Yoda., and Yamasaki, M. 1994. The hypo-osmolarity-sensitive phenotype of the *Saccharomyces cerevisiae hpo2* mutant is due to a mutation in *PKC1*, which regulates expression of β -glucanase. *Mol Gen Genet* **242**:641-648.
- Silva, L., Coutinho, A., Fedorov, A., and Prieto, M. 2003. Conformation and self-assembly of a nystatin nitrobenzoxadiazole derivative in lipid membranes. *Biochim Biophys Acta* **1617**:69-79.
- Singer, S.J., and Nicolson, G.L. 1972. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science* **175**:720-731.

- Skou, J.C. 1965. Enzymatic basis for active transport of Na⁺ and K⁺ across a cell membrane. *Physiol Rev* **45**:596-617.
- Slater, E.C. 1953. Mechanisms of phosphorylation in the respiratory chain. *Nature* **172**:975-978.
- Skulachev, V.P. 1971. Energy transformations in the respiratory chain. *Curr Top Bioenerg* **4**:127-190.
- Sudhof, T.C. 2004. The synaptic vesicle cycle. *Annu Rev Neurosci* **27**:509-547.
- Sutton, D.D., Arnow, P.M., and Lampen, J.O. 1961. Effect of high concentrations of nystatin upon glycolysis and cellular permeability in yeast. *Proc Soc Exp Biol NY* **108**:107-175.
- Svihla, G., Dainko, J.L., and Schlenk, F. 1969. Ultraviolet micrography of penetration of exogenous cytochrome c into the yeast cell. *J Bacteriol* **100**:498-504.
- Sychrova, H., Ramírez, J. and Peña, A. 1999. Involvement of Nha1 antiporter in regulation of intracellular pH in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol Lett* **171**:167-172.
- Theuvenet, A.P.R., Nieuwenhuis, B.J.W.M., van de Mortel, J., and Borst-Pauwels, G.W.F.H. 1986. Effect of ethidium bromide and DEAE-dextran on divalent cation accumulation in yeast. Evidence for an ion-selective extrusion pump for divalent cations. *Biochim Biophys Acta* **855**:383-390.
- Thomson, J.M., Gaucher, E.A., Burgan, M.F., De Kee, A.W., Li, T., Aris, J.P., and Benner, S.A. 2005. Resurrecting ancestral alcohol dehydrogenases from yeast. *Nat Gen* **37**:630-635.
- Tolins, J.P., and Rajj, L. 1988. Adverse effect of amphotericin B administration on renal hemodynamics in the rat: neurohumoral mechanisms and influence of calcium channel blocker. *J Pharmacol Exp Ther* **245**:594-599.
- Uchida, E., Ohsumi, Y., and Anraku, Y. 1988. Purification of the yeast vacuolar membrane H⁺-ATPase and enzymological discrimination of three ATP-driven proton pumps in *Saccharomyces cerevisiae*. *Methods Enzymol* **157**:544-562.
- Vallejo, C.G. and Serrano, R. 1989. Physiology of mutants with reduced expression of plasma membrane H⁺-ATPase. *Yeast* **5**:307-319.

- van de Rest, M., Kamminga, A.H., Nakano, A., Anraku, Y., Poolman, B., and Konings W.N. 1995. The plasma membrane of *Saccharomyces cerevisiae*: structure, function and biogenesis. *Microbiol Rev* 59:304-322.
- van der Vaart, J.M., Caro, L.H.P., Chapman, J.W., Klis, F.M., and Verrips, C.T. 1995. Identification of three mannoproteins in the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol* 177:3104-3110.
- Van't Hoff, H.J. 1877. Die Rolle des osmotischen Druckes in der Analogie zwischen Lösungen und Gasen. *Z. Phys Chem* 1:481-508.
- Venard, R., Brethes, D., Giraud, M.F., Vaillier, J., Velours, J., and Haraux, F. 2003. Investigation of the role and mechanism of IF1 and STF1 proteins, twin inhibitory peptides which interact with the yeast mitochondrial ATP synthase. *Biochem* 42:7626-36.
- Vida, T.A., Huyer, G., and Emr, S.D. 1993. Yeast vacuolar proenzymes are sorted in the late Golgi complex and transported to the vacuole via a prevacuolar endosome-like compartment. *J Cell Biol* 121:1245-1256.
- Wada, Y., Ohsumi, Y., Tanifuji, M., Kasai, M., and Anraku, Y. 1987. Vacuolar ion channel of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 262:17260-17263.
- Wadskog, I., and Adler, L. 2003. Ion homeostasis in *Saccharomyces cerevisiae* under NaCl stress. In *Topics in Current Genetics*, Vol. I. S. Hohmann/P.W.H. Mager (Eds). *Yeast Stress Responses*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. Chap. 5. pp. 201-229.
- Wells, K.M. and Rao, R. 2001. The yeast Na⁺/H⁺ exchanger Nhx1 is an N-linked glycoprotein. Topological implications. *J Biol Chem* 276:3401-3497.
- Wieczorek, H., Grüber, G., Harvey, W.R., Huss, M., Menzendorfer, H., and Zeiske, W. 2000. Structure and regulation of insect plasma membrane H⁽⁺⁾V-ATPase. *J Exp Biol* 203:127-135.
- Wiemken, A., and Nurse, P. 1973. Isolation and characterization of the amino-acid pools located within the cytoplasm and vacuoles of *Candida utilis*. *Planta* 109:293-306.
- Wiemken, A.M., and Dürr, M. 1974. Characterization of amino acid pools in the vacuolar compartment of *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch Microbiol* 101:45-57.

- Wiemken, A.M., Schellenberg, M., and Urech, K. 1979. Vacuoles: the sole compartments of digestive enzymes in yeast (*Saccharomyces cerevisiae*)?. *Arch Microbiol* **123**:23-35.
- Wolska-Mitaszko, B., Jakubowicz, T., Kucharzewska, T., and Gaior, E. 1981. An efficient technique for the isolation of yeast spores and the preparation of spheroplasts lysates active in protein synthesis. *Anal Biochem* **116**:241-247.
- Yang, Y-C. Bastos, M., and Yu-Chen, K. 1993. Effects of osmotic stress and growth stage on cellular pH and polyphosphate metabolism in *Neurospora crassa* as studied by ³¹P nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Biochim Biophys Acta* **1179**:141-147.
- Yang, M., Jensen, L.T., Gardner, A.J., and Culotta, V.C. 2005. Manganese toxicity and *Saccharomyces cerevisiae* Mam3p, a member of the ACDP (ancient conserved domain protein) family. *Biochem J* **386**:479-487.
- Yenush, L., Mulet, J.M., Ariño, J., and Serrano, R. 2002. The Ppz protein phosphatases are key regulators of K⁺ and pH homeostasis: implications for salt tolerance, cell wall integrity and cell cycle progression. *EMBO* **21**:920-929.
- Zinser, E., Sperka-Gottlieb, C.D.M., Fasch, E.V., Kohlwein, S.D., Paltauf, F., and Daum, G. 1991. Phospholipid synthesis and lipid composition of subcellular membranes in the unicellular eukaryote *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol* **173**:2026-2034.

7. ANEXO

Manuscrito:

“*In situ* study of K^+ transport into
the vacuole of *Saccharomyces cerevisiae*”

Martínez-Muñoz, G.A., and Peña, A. 2005.
Yeast **22**:689-704.

Publicado

Research Article

In situ study of K^+ transport into the vacuole of *Saccharomyces cerevisiae*

Gloria A. Martínez-Muñoz* and Antonio Peña

Department of Molecular Genetics, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado 70-600, 4510 México D.F., México

*Correspondence to:

Gloria A. Martínez-Muñoz,
Instituto de Fisiología Celular,
UNAM, Apartado 70-600,
04510 México D.F., México.
E-mail: gmartine@ifcunam.mx

Abstract

Permeable spheroplasts were prepared from two strains of *Saccharomyces cerevisiae* by incubating with zymolyase without a permeabilizing agent. The loss of the plasma membrane barrier was confirmed by the nucleotide release, the activity of glucose 6-phosphate dehydrogenase with external substrates and by the effects on respiration of mitochondrial substrates and ADP. Mitochondrial integrity was maintained, as shown by respiration with lactate, pyruvate, glucose and ethanol, and its acceleration by ADP showed a coupled respiration. Potassium uptake into the vacuole was measured with a selective electrode and found to be taken up effectively by spheroplasts only in the presence of Mg-ATP; it was reverted by CCCP and PCP and inhibited by bafilomycin A_1 , but not by sodium vanadate or sodium azide. Potassium ions did not alter $\Delta\Psi$ of the vacuole, followed with oxonol V, but caused vacuolar alkalization, as followed with pyranine. The increase of vacuolar pH was non-selective and observed at 50–200 mM of several monovalent cations. Isolated vacuoles with pyranine inside showed similar changes of the internal pH in the presence of KCl. Results indicate that some strains do not require a permeabilizing agent to directly access the vacuole in spheroplasts prepared with zymolyase. The hypothesis about the existence of a K^+/H^+ antiporter in the vacuolar membrane of *S. cerevisiae* is discussed. Copyright © 2005 John Wiley & Sons, Ltd.

Keywords: yeast; vacuole; spheroplasts; K^+ transport; internal pH

Received: 28 February 2005
Accepted: 27 April 2005

Introduction

Potassium ion is a fundamental cation for *Saccharomyces cerevisiae*; it stimulates fermentation (Rothstein and Demis, 1953) and respiration (Peña *et al.*, 1969; Peña, 1975). It has also been reported that K^+ is partly accumulated with bicarbonate as a counter-ion (López *et al.*, 1999) and it participates in the modulation of the internal pH in yeast (Calahorra *et al.*, 1998; Ramírez *et al.*, 1996). The role of the different K^+ transporters in yeast is being studied in order to get a clearer scheme of its dynamics (Wadskog and Adler, 2003) as well as in the regulation of the internal pH of the cell.

The yeast vacuole is the major site of intracellular storage for numerous molecules and ions

(Klionsky *et al.*, 1990), mainly K^+ (Okorokov *et al.*, 1980) and Ca^{2+} (Halachmi and Eilam, 1996). Besides, this organelle plays an important role in ionic homeostasis, pH and osmoregulation (Bryant and Stevens, 1998). The vacuole contains a proton translocating ATPase, the V-ATPase (Uchida *et al.*, 1988; Powell *et al.*, 2000). Thanks to the $\Delta\mu_{H^+}$ (proton electrochemical potential difference) imposed through the vacuolar membrane by the V-ATPase, numerous ions and metabolites are transported into this cell compartment against a concentration gradient (Klionsky *et al.*, 1990).

All these factors mean that the vacuole is not only an important storage organelle, it also plays a central role in ionic homeostasis and internal pH regulation (Klionsky *et al.*, 1990). Yeast contains a concentration of potassium of 100–200 mM (López

et al., 1999) and a high proportion of this cation is concentrated in the vacuole (Okorokov *et al.*, 1980).

Nass and Rao (1998) described the existence of a Na⁺/H⁺ antiporter (Nhxlp) in the prevacuolar compartment of yeast, which plays an important role in osmotolerance (Nass and Rao, 1999) and has provoked a growing interest in the study of the entrance of Na⁺ and K⁺ into the prevacuolar compartments. Also, an important membrane potential-dependent cation channel in yeast vacuolar membrane has been characterized by Wada *et al.* (1987). This ion channel conducts K⁺ and several other monovalent cations (Cs⁺, Na⁺ and Li⁺). However, further studies on K⁺ transport into the vacuole of yeast are necessary.

Several techniques have been reported to measure the contents and/or transport into the yeast vacuole, varying from the isolation of vacuoles (Guern *et al.*, 1989) or vacuolar membranes to the preparation of vesicles (Ohsumi and Anraku, 1981). Also cells permeabilized with DEAE-dextran (Huber-Wälchli and Wiemken, 1979; Theuvenet *et al.*, 1986) and cupric ions (Ohsumi *et al.*, 1988) have been used. The latter have been extensively used mainly for the differential extraction of vacuolar and cytoplasmic contents (Keenan and Weiss, 1997). Techniques for plasma membrane permeabilization have been applied for diverse purposes as the *in situ* study of enzymatic activities or the purification of enzymes by using different treatments with detergents, such as cetyltrimethylammonium (Joshi *et al.*, 1987) and digitonin (Gowda *et al.*, 1988) or mechanical methods and freeze-thaw cycles (Oliveira *et al.*, 1981).

Unlike the methods mentioned above, we were interested in studying the bioenergetics of the vacuole with the main goal of implementing a technique of permeabilized spheroplasts useful for the *in situ* study of potassium transport into the vacuole. Permeabilized spheroplasts were prepared according to Avéret *et al.* (1998) with slight changes, the main one being not using a permeabilizing agent. Permeable spheroplasts were obtained, which maintained the functional integrity of the vacuole and allowed the characterization of K⁺ transport into this organelle. The results indicated that potassium ions could be transported through a putative K⁺/H⁺ antiporter.

Materials and methods

Strains and culture conditions

Cells from an isolated colony of baker's yeast (La Azteca) were grown in 100 ml YPD medium (2% glucose, 1% yeast extract, 1% bacto-peptone) for 24 h at 30 °C. The cellular suspension was then added to 1 l the same medium and the cells were grown for 6 h at 30 °C. The cells were harvested and washed twice with water by centrifugation. They were resuspended in 250 ml water and starved for 16 h by aeration at 30 °C. Then they were collected and washed, and resuspended in water at a ratio of 0.5 g (wet weight)/ml. For the measurements of mitochondrial respiration, commercial yeast La Azteca was grown for 24 h in 100 ml medium containing 1% yeast extract, 0.1% potassium phosphate, 0.12% ammonium sulphate and 2% lactate as carbon source, for 24 h at 30 °C. Then, this preinoculum was added to 1 l of the same medium and the cells were grown for 16 h under vigorous aeration at 30 °C. At the end of the incubation, cells were resuspended in water to a ratio of 0.5 g (wet weight)/ml. For the BY4742 strain, the growth conditions were the same as La Azteca, except that all media included 120 mg/l uracil.

Preparation of spheroplasts

Spheroplasts for both strains were prepared as reported by Avéret *et al.* (1998) with slight modifications, using zymolyase 20 T (ICN). However, since the used strains were found not to require nystatin, incubation with this compound was omitted. Cells (1 g dry weight) were washed twice with 20 ml distilled water and incubated for 15 min with gentle shaking at 32 °C in 20 ml 0.5 M β -mercaptoethanol, 0.1 M Tris-HCl, pH 9.3. The cells were washed three times with Buffer A: 0.75 M sorbitol, 0.4 M mannitol (both deionized), 10 mM maleic acid-Tris, pH 6.8, and 0.1% bovine serum albumin (BSA). Then, the cells were resuspended in 20 ml 1.35 M sorbitol, 1 mM ethylene glycol bis-(α -aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid (EGTA) and 10 mM citrate-phosphate (pH 5.8). Zymolyase (5 mg) was added and the cells were incubated for about 30 min at 32 °C with gentle shaking. Spheroplasts were centrifuged at 2500 r.p.m. for 5 min, washed three times with Buffer A and resuspended in buffer B: 1.35 M sorbitol, 10 mM 2-[N-morpholino]ethanesulphonic acid

(MES) adjusted to pH 6.0 with triethanolamine (TEA) and 0.1% BSA. Spheroplasts prepared from cells grown in lactate medium were resuspended in 1 M sorbitol, 1.7 mM NaCl, 2 mM MgSO₄, 0.5 mM EGTA, 10 mM potassium phosphate and 0.1% BSA, pH 6.8. Immediately before each assay, spheroplasts were aerated for 30 min at 30 °C and used within the same day of preparation.

Vacuole isolation

Vacuoles were prepared according with Ohsumi and Anraku (1981) with some modifications. They were isolated from 50 g yeast grown for 6 h in YPD and starved for 16 h. Spheroplasts were prepared according to the technique described above, and after washing with buffer A, they were washed twice in YPD-sorbitol 1 M according to Kane (1995). The spheroplasts were resuspended in 10 volumes of buffer C: 10 mM MES-Tris, pH 6.9, 0.1 mM MgCl₂, 12% Ficoll, homogenized in a loosely fitting Dounce homogenizer and centrifuged in a swinging bucket rotor SW28Ti at 26 600 × *g* for 30 min. The white layer at the top of the tubes, which contained most of the vacuoles, was collected and resuspended in Buffer C with a homogenizer. Then, a 5 ml volume of these crude vacuoles was layered on top of centrifuge tubes with 5 ml buffer D: 10 mM MES-Tris, pH 6.9, 0.5 mM MgCl₂, 8% Ficoll. The tubes were centrifuged in a swinging bucket rotor SW40Ti under the conditions described above. The vacuoles recovered from the top were resuspended in buffer B.

Nucleotide efflux in spheroplasts

Spheroplasts were prepared as described and aliquots of them were taken at different incubation times with zymolyase. Spheroplasts were briefly shaken, and centrifuged, and the supernatant recovered. Proteins were precipitated with 25% trichloroacetic acid and nucleotides were determined by absorbance at 260 nm in the deproteinized supernatant.

Glucose 6-phosphate dehydrogenase assay

During the preparation of spheroplasts, aliquots were taken at different incubation times with zymolyase. Spheroplasts were briefly shaken, and

washed with buffer B for three times and resuspended in buffer A. Assay of glucose 6-phosphate dehydrogenase activity was carried out according to Avéret *et al.* (1998) with slight modifications. Protein of spheroplasts (1 mg) was preincubated for 10 min at 25 °C in 20 mM Hepes (N-[2-hydroxyethyl]piperazine-N'-[2-ethanesulphonic acid], pH 7.4, and 1 M sorbitol. 3 mM glucose 6-phosphate and 20 µg/ml antimycin were then added and the reaction was started with 0.13 mM NADP⁺. Absorbance at 340 nm was recorded for 5 min at 25 °C.

Respiration

Oxygen consumption was measured with a Clark electrode at 30 °C in a temperature-controlled chamber, with an appropriate polarization and data acquisition system. Experimental conditions are indicated under each assay.

Transport of K⁺ by spheroplasts

Potassium uptake was measured by recording its extracellular concentration with a potassium-selective electrode connected to a potentiometer (Beckman Selection 2000) and a computer. The incubation mixture was 1 mM 3-(N-morpholino) propanesulphonic acid MOPS-TEA buffer (pH 7.0), 1.35 M sorbitol and 0.1% BSA plus 50 µM sodium vanadate and 5 µg/mg protein oligomycin. The electrode signal changes were calibrated by additions of 10 µM KCl.

Vacuolar membrane potential

Creation of membrane potential ($\Delta\Psi$) across the vacuolar membrane was followed by the fluorescence quenching of oxonol V (Calahorra *et al.*, 1987). Spheroplasts (1 mg protein) were added to a cuvette containing 10 mM MES-TEA, pH 6.5, 1.35 M sorbitol, 5 mM MgSO₄, 50 µM sodium vanadate, and 5 µg/mg protein of oligomycin. To follow the internal positive membrane potential generated by ATP, 2 µM oxonol V was included and the reaction was started by the addition of 5 mM ATP-Tris. Fluorescence was followed at 580–640 nm.

Intracellular K⁺

Cells (20 mg) or the equivalent amount of spheroplasts (wet weight) were diluted to 5 ml 10 mM

MES-TEA (pH 6.0) and disrupted by boiling in a water bath for 20 min and centrifuged. Potassium was measured in an adequate dilution of the supernatant with a Zeiss PF5 flame photometer.

Introduction of pyranine to the vacuole of spheroplasts and isolated vacuoles

Spheroplasts (1 mg protein) were incubated in buffer B with 5 mM ATP-Tris, 5 mM MgSO₄, 50 μM sodium vanadate and 3 μM pyranine for 1 h at 30°C with gentle shaking. Spheroplasts were centrifuged and washed three times and suspended with buffer B. Vacuoles (1 mg protein) were incubated under the same conditions except for sodium vanadate.

Measurement of vacuolar pH in spheroplasts and isolated vacuoles

Vacuolar pH in spheroplasts or isolated vacuoles was quantified according to Peña *et al.* (1995) without electroporation. Spheroplasts (1 mg protein) or vacuoles preincubated with pyranine (see above), were incubated in 2 ml 10 mM MES-TEA, pH 6.5, 1.35 M sorbitol 0.1% BSA and 5 mM MgSO₄. Fluorescence changes were monitored at 460–520 nm. Calculations of pH were carried out according to Peña *et al.* (1995). Total pyranine was calculated by subtracting the fluorescence value with 100 mM NH₄OH minus the value with 50% propionic acid. External pyranine was evaluated by the fluorescence at pH 8 (10 mM bicine-TEA, pH 8, 1.35 M sorbitol) minus the value at pH 4 (10 mM, tartaric acid, pH 4, 1.35 M sorbitol) multiplied by the correction factor 1.16. Internal pyranine was calculated by subtracting total minus external pyranine. The corrected fluorescence values of the acid and dissociated forms of pyranine were used to calculate internal pH by using the Henderson-Hasselbalch equation with a *pK* value of 7.2.

All fluorescence changes were monitored at 460–520 nm, with a slit width of 4 nm, in a DMX-100 spectrofluorometer with a thermostated chamber at 30°C and a magnetic stirrer, which was connected to an acquisition and processing system (SLM Instruments, Urbana, Ill.).

Confocal microscopy

Confocal images were obtained with a MCR 1024 BIO-RAD laser scanning system equipped with

a Kr/Ar air-cooled laser attached to an inverted Nikon TMD 300 microscope. Images were collected with a Nikon oil-immersion 40× objective. Spheroplasts from La Azteca with pyranine inside vacuole (see above) were excited with the 488 nm line of the laser and emitted light was band-passed at 585 nm. Confocal images were viewed, processed and converted to TIFF format with Todd Clark's program Confocal Assistant 4.2.

ATPase activity assay

The ATPase activity was measured in spheroplasts according to Calahorra *et al.* (1987). The assay was performed with 0.25 mg protein in 250 μl 10 mM MES-TEA buffer, pH 6.0, 5 mM MgCl₂, 0.5 mM ATP-Tris and 1 mM ammonium molybdate was added. 2.5 mM diethylstilbestrol (DES), 2 mM sodium azide and 10 μM bafilomycin A₁ were added where indicated. The reaction was started by the addition of the protein and the mixture was incubated for 10 min at 30°C. The reaction was stopped by the addition of 100 μl 30% trichloroacetic acid and the tubes were transferred to an ice bath. They were centrifuged and phosphate liberated was measured in the supernatant by the method of Fiske and Subbarow (1925).

Protein

Protein was quantified according with the method of Peterson (1977). Bovine serum albumin was used as standard.

Reagents

All reagents were of the highest quality available. Mannitol and sorbitol used for the buffers were deionized using an AG50W-X8 resin (BIO-RAD).

Results

Characterization of the model

Permeability of the plasma membrane

Aliquots of yeast incubated with zymolyase were withdrawn at different times of incubation (Figure 1A, La Azteca and B, BY4742 strains); they were lysed by gentle agitation in water to follow the percentage decrease of OD at 660 nm.

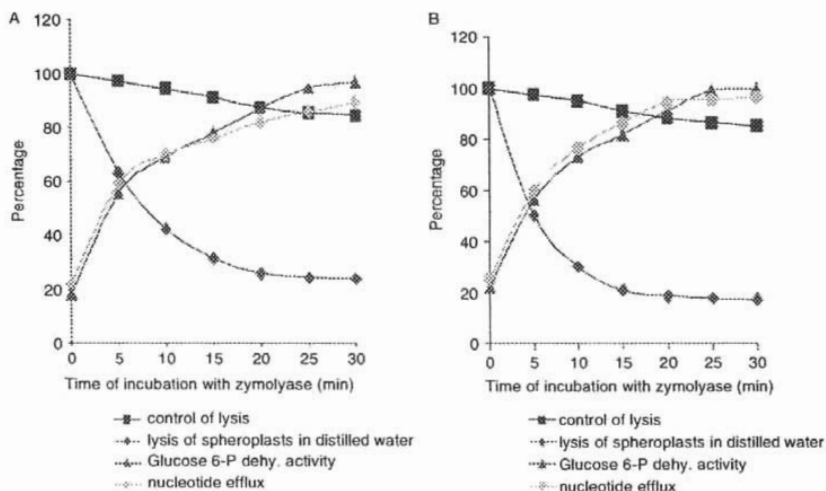


Figure 1. Efflux of nucleotides and glucose 6-phosphate dehydrogenase activity during incubation of yeast cells with zymolyase (A, La Azteca strain; B, BY4742 strain). Yeast grown to the exponential phase in YPD media and starved was incubated with zymolyase to convert them to spheroplasts. Aliquots were withdrawn at different times to carry out the assays. Spheroplasts were diluted in: buffer A (see Materials and methods) (blue squares) or were lysed in distilled water (green rhomboids). In both cases, values were expressed as the percentage decreases of OD_{660 nm} with respect to the value at starting incubation with zymolyase. In another assay, aliquots were briefly shaken and centrifuged, and nucleotides were measured in the deproteinized supernatant at 260 nm (yellow circles). Values were expressed as the percentage increases of OD_{260 nm} with respect to the value at 30 min. For glucose-6-phosphate dehydrogenase activity (red triangles), 1 mg protein of spheroplasts was preincubated for 10 min at 25 °C in 20 mM Hepes (pH 7.4), 1 M sorbitol. After the addition of 3 mM glucose 6-phosphate and 20 mg/ml antimycin, the reaction was started with 0.13 mM NADP⁺. Absorbance at 340 nm was followed during 5 min at 25 °C. Values were expressed as the percentage increases of OD_{340 nm} with respect to the value at 30 min of incubation with zymolyase

The absorbance showed a rapid decrease during the first 20 min and reached a plateau in about 30 min. Spheroplasts formation showed a yield of about 80%. Control of lysis of spheroplasts was carried out by following the decrease of OD at 660 nm of the same aliquots of yeast but, instead of water to produce the lysis, they were resuspended in buffer A (see Materials and methods). A small lysis of 15% of the spheroplasts after the sole zymolyase treatment was observed, which did not constitute a problem for the model of permeabilized spheroplasts. Viability of spheroplasts was not studied, since we were interested in the integrity of the cellular organelles and not of the whole cell.

Numerous metabolites have been measured during permeabilization of the cells such as material absorbing at 260 nm (Ohsumi *et al.*, 1988;

Huber Wälchli and Wiemken, 1979), cytosolic aminoacids (Ohsumi *et al.*, 1988) and ATP (Förster *et al.*, 1998). Also, enzymatic activities have been detected with external substrates, such as β -galactosidase (Joshi *et al.*, 1987) hexokinase, malate dehydrogenase and others (Serrano *et al.*, 1973). We chose the release of nucleotides (Ohsumi *et al.*, 1988) and glucose-6-phosphate dehydrogenase activity (Serrano *et al.*, 1973) as appropriate indicators of spheroplast permeability. Figure 1 (A, La Azteca; B, BY4742) shows that nucleotide release and glucose-6-phosphate dehydrogenase activity increased in close correlation with the formation of lysable spheroplasts during incubation with zymolyase. Results suggested that the spheroplasts from both strains were permeable without addition of permeabilizing agent.

Functional integrity of internal organelles in spheroplasts

Table 1 lists the values of oxygen uptake rates in La Azteca strain for intact cells and spheroplasts. In intact cells, all substrates stimulated respiration, even lactate and pyruvate, as expected from cells grown in lactate medium, since lactate transporter Jen1p is specifically induced in cells grown with lactate (Casal *et al.*, 1995) and it has been reported to be also able to transport pyruvate (De Hertogh *et al.*, 2002). Glucose is transported through Hxt1-Hxt4 plus Hxt6 and Hxt7 which are the most important transporters for this substrate in yeast (Elbing *et al.*, 2004). Finally, ethanol is freely permeable across biological membranes. In spheroplasts, however, both lactate and pyruvate, but particularly the former, produced a higher stimulation of respiration, which besides, with lactate, was increased more than five fold for lactate and four fold with pyruvate

in the presence of ADP, as compared to respiration without substrate in the absence of ADP (State 4). Glucose and ethanol also produced an increased respiration, but particularly with glucose, the incubation medium required the addition of ATP and NAD⁺ (Sutton *et al.*, 1961). Probably the most important finding was the coupling of respiration with all substrates; that is, the stimulation by ADP, a substrate of oxidative phosphorylation which is impermeant to intact cells, which also indicated the functional integrity of mitochondria.

In another series of experiments not shown, it was found that 2.5 μ M carbonyl cyanide 3-chlorophenylhydrazone (CCCP) also stimulated the respiration of spheroplasts. It was concluded that spheroplasts were permeable and nystatin as permeabilizing agent was not required. In fact, incubation with nystatin (2.5 μ M/mg protein) provoked a decrease in the respiration rate with lactate in both strains (not shown).

Table 1. Respiratory rates of intact La Azteca yeast and spheroplasts with different substrates

Intact yeast

Substrate	natg of O ₂ /min/mg	Stimulation by substrate (%)
None	24.4 \pm 7.1	—
Lactate	28.6 \pm 8.6	17.1
Pyruvate	34.7 \pm 10	42
Glucose	28.2 \pm 9.3	15.4
Ethanol	33.4 \pm 9.5	36.7

Spheroplasts (mitochondria)

Substrate	natg of O ₂ /min/mg		Stimulation by substrate (%)		
	State 4 (No ADP)	State 3 (plus ADP)	(No ADP)	(plus ADP)	State 3/4
None	105 \pm 9	—	—	—	—
Lactate	224 \pm 8	559 \pm 7	113	432	2.5
Pyruvate	177 \pm 18	406 \pm 11	69	286	2.3
Glucose	169 \pm 10	334 \pm 26	61	218	2.0
Ethanol	153 \pm 12	275 \pm 18	46	161	1.8

Respiratory rates were measured as described in Materials and methods. La Azteca intact yeast (25 mg, wet weight) was incubated in 10 mM HEPES-TEA, pH 7.0. Spheroplasts (2 mg protein) obtained from the same yeast grown aerobically in lactate were aerated for 30 min at 30 °C. Incubation medium: 10 mM KH₂PO₄ (pH 7.0), 1 M sorbitol, 0.1% BSA plus 1.7 mM NaCl, 2 mM MgSO₄ and 0.5 mM EGTA to final volume of 5 ml. 10 mM each substrate was used (except ethanol, which was 109 mM) and 100 μ M ADP. To assays with lactate and ethanol, 2 mM NAD⁺ was added; when glucose was the substrate for spheroplasts, the medium was supplemented with 2 mM ATP, 2 mM NAD⁺ and 10 mM NH₄Cl. Results are expressed as natg of O₂ consumed/min, and O₂ consumed/mg wet weight in the case of intact cells, and mg of protein for spheroplasts, and are the means of three experiments \pm SD.

Vacuolar H⁺-ATPase activity

Having found indications of the functional integrity of the mitochondria, since the main objective of this work was to study the vacuolar transport in the permeabilized spheroplasts, the activity of the V-ATPase, enzyme responsible for the generation of pH gradient (ΔpH) and membrane potential ($\Delta\psi$) through the vacuolar membrane (Mellman *et al.*, 1986; Forgac, 1999) was quantified. Table 2 shows the specific activities of V-ATPase, plasma membrane H⁺-ATPase (P-type ATPase) (Serrano, 1986) and mitochondrial H⁺-ATPase (F₁-F₀ ATPase or F-ATPase) quantified in spheroplasts of La Azteca strain. Activities were calculated from the effects of the specific inhibitors for each one of the three enzymes at pH 6.0 and in presence of 1 mM ammonium molybdate as inhibitor of phosphatases (Leigh and Walker, 1980). V-ATPase was inhibited with 10 μM bafilomycin A₁, plasma membrane ATPase was inhibited with 2.5 mM diethylstilbestrol (DES) and F-ATPase was inhibited with 2 mM sodium azide. The highest activity was that of the plasma membrane ATPase, deduced from the 64.2% of inhibition of total ATPase activity with

DES. This result was in agreement with Serrano (1980) who reported that the plasma-membrane ATPase is the major ATP-consuming pathway in yeast. In view of the high activity of the plasma membrane ATPase, sodium vanadate 50 μM was added in all further assays. Percentage inhibition with bafilomycin A₁ showed that 25% of total ATPase activity is due to the V-ATPase. The H⁺-ATPase activity detected in permeabilized spheroplasts, encouraged us to study transport systems in the vacuole. The generation of ΔpH and $\Delta\psi$ confirmed the structural integrity of the vacuole (see next). Absence of any effect of 2 mM sodium azide on the total ATPase activity in spheroplasts indicated the absence of F-ATPase activity. We have carried out experiments with isolated yeast mitochondria (not shown) which demonstrate that the F-ATPase activity is extremely low, it can not be stimulated by uncouplers and it is only measurable in mitochondria disrupted by placing them in a hypotonic medium or in the presence of permeabilizing agents (Venard *et al.*, 2003). However, oligomycin was added to all assays to avoid any possible interference by this enzyme activity.

Table 2. ATPase activities of spheroplasts; effects of inhibitors

Inhibitor	ATPase activity	
	(nmol Pi/mg/min)	Inhibition (%)
None	96 ± 15	0
Bafilomycin A ₁ (10 μM)	72 ± 12	25
DES (2.5 mM)	34 ± 8	64.2
Sodium azide (2 mM)	97 ± 9	0
DES and sodium azide	33 ± 9	65.7
DES and bafilomycin A ₁	9 ± 3	90.4
Sodium azide and bafilomycin A ₁	73 ± 10	23.7
All three inhibitors	9 ± 4	90.5

Yeast grown to the exponential phase in YPD media and starved was converted to spheroplasts with zymolyase (see Materials and methods). Spheroplasts (0.25 mg protein) were incubated at 30 °C in a final volume of 0.25 ml containing 10 mM MES-TEA buffer, pH 6.0, 5 mM MgCl₂, 0.5 mM ATP-Tris, 1 mM ammonium molybdate and the indicated concentrations of other inhibitor(s). The reaction was stopped after 30 min with 100 μl 30% trichloroacetic acid and the tubes transferred to an ice bath. The tubes were centrifuged and the phosphate liberated was measured in the supernatants according to Fiske and Subbarow (1925). Results are expressed in nmol Pi/mg/min and are the mean of three measurements ± SD. Percentages were calculated taking as 100% the activity without inhibitors.

Vacuolar potassium transport on spheroplasts

Because of the plasma membrane permeabilization in the spheroplasts, the study of K⁺ transport to the vacuole was considered. Figure 2 shows that when Mg-ATP was added to spheroplasts of La Azteca strain, potassium in the medium decreased. The disappearance of external potassium was inhibited by bafilomycin A₁, a specific inhibitor of the V-ATPases, suggesting that potassium was transported into the vacuole. Pentachlorophenol (PCP) and CCCP (not shown) also reverted the effect of Mg-ATP, indicating the requirement of a proton gradient across the vacuolar membrane for the K⁺ entrance to the vacuole.

Potassium content in spheroplasts

Spheroplasts prepared from yeast incubated with zymolyase lost much of their cytoplasmic potassium, but since the vacuole maintains its integrity, it was possible to quantify the potassium content of this organelle. Table 3 shows the percentage of potassium found in spheroplasts; those prepared from non-starved yeast La Azteca (250 mM total K⁺) maintained 55% of the initial potassium and

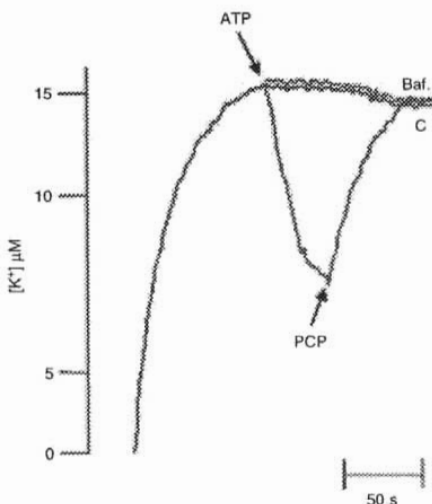


Figure 2. K^+ transport in spheroplasts from La Azteca strain. Yeast cells grown to the exponential phase in YPD and starved were converted to spheroplasts (see Materials and methods) and transport of K^+ was monitored using a selective K^+ electrode. The mixture contained 1 mg spheroplast protein in 1 mM MOPS-TEA buffer (pH 7.0), 1.35 M sorbitol, 0.1% BSA, 50 μ M sodium vanadate, and 5 μ g/mg protein oligomycin, in a final volume of 5 ml at 30°C. The tracings were started after 10 s with the addition of spheroplasts; 5 mM Mg-ATP or 10 μ M PCP (green line) were as indicated. In the tracing with 10 μ M bafilomycin A_1 (red line), the inhibitor was added from the beginning of the trace. Control without any addition to the spheroplasts is indicated (blue line)

spheroplasts from starved yeast (150 mM total K^+) retained 35% of the cation. BY4742 strain showed $[K^+]$ values similar to La Azteca strain. Spheroplasts prepared from non starved yeast (203.5 mM total K^+) stored in the vacuole 41.8% of the initial potassium and spheroplasts from starved yeast (131.5 mM total K^+) retained 27%. Okorokov *et al.* (1980) found that the vacuole is the main storage compartment for ions and metabolites in the yeast. Accordingly, we expected that most of the potassium ions stored in the permeabilized spheroplasts are in the vacuole, although some contribution may exist from other organelles, such as the mitochondria.

It was also observed that starvation caused a higher loss of potassium content in spheroplasts

Table 3. Concentration (mM) of K^+ of intact yeast cells and spheroplasts in both strains

		Intact yeast	Spheroplasts
La Azteca	Non starved	250 \pm 15	138 \pm 10
	Starved yeast	150 \pm 18	52.5 \pm 12
BY4742	Non starved	203.5 \pm 24	83 \pm 11
	Starved yeast	131.5 \pm 21	46 \pm 13

Yeast (La Azteca and BY4742 strains) was grown to the exponential phase in YPD. Spheroplasts were prepared from starved and non-starved yeast from both strains. Cells were starved by aeration for 16 h at 30°C in water in a gyratory shaker (see Materials and methods). The same equivalent wet weight of yeast cells or spheroplasts starved and non starved (20 mg) was diluted to 5 ml 10 mM MES-TEA (pH 6.0). The suspensions were boiled in a water bath for 20 min and centrifuged. The supernatants were used to measure K^+ in a flame Zeiss PF5 photometer. Results of three are the mean of three determinations \pm SD.

than in intact yeast cells. Intact yeast cells of La Azteca and BY4742 strains lost 40% and 35.4% after starvation, respectively, while spheroplasts lost 62% and 45.9% in the same order. These results suggested that a large part of the potassium liberated from the vacuole during starvation was retained in the cytoplasm.

Vacuolar membrane potential

It was expected that with the addition of Mg-ATP, the activity of the V-ATPase in spheroplasts would allow the creation of a vacuolar membrane potential, which could be detected by the fluorescence quenching of oxonol V. In both strains, increasing concentrations of ATP provoked an increase of $\Delta\psi$, higher at 10 mM ATP (Fig 3A, La Azteca; Figure 3B, BY4742). Similar measurements were carried out at different Mg^{2+} concentrations and external pH, and the optimal conditions were 5 mM Mg^{2+} and pH 6.5 (not shown). As Figure 3 shows, the addition of Mg-ATP produced the quenching of fluorescence of oxonol V, which could be reversed by both protonophores CCCP and PCP. It was also observed that bafilomycin A_1 prevented the effect of Mg-ATP on the quenching of fluorescence. Glucose, on the other hand, had no effect on the oxonol V fluorescence, as expected in permeabilized spheroplasts (Figure 3C). Then, in order to study the effect of K^+ transport into the vacuolar membrane potential difference, 200 mM KCl was added after ATP. As shown in Figure 3 (B, BY4742; C, La Azteca) no change of the vacuolar $\Delta\psi$ was observed after KCl addition in both strains.

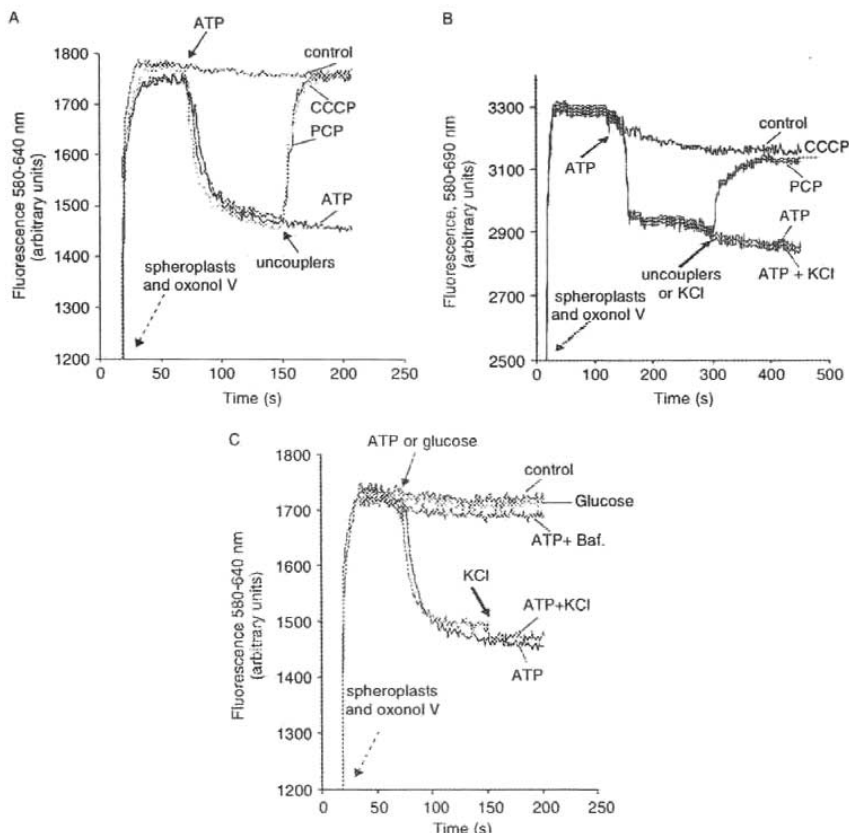


Figure 3. Vacuolar membrane potential in the spheroplasts. Yeast cells (La Azteca strain) grown to the exponential phase in YPD media and starved were converted to spheroplasts as indicated in Materials and methods. Vacuolar membrane potential was recorded by following the changes of fluorescence at 580–640 nm (ex/em). Incubation mixture: 10 mM MES-TEA (pH 6.5), 1.35 M sorbitol, 5 mM MgSO₄, 50 μ M sodium vanadate, 5 μ g/mg protein oligomycin; final volume, 2.0 ml. The tracing was started at 5 s by the addition of 1 mg spheroplast protein, followed by 2 μ M oxonol V. (A) 5 mM ATP-Tris (black line), 10 μ M uncoupler (PCP or CCCP, blue and yellow lines, respectively). (B) Effect of 5 mM ATP-Tris (black line), 10 μ M uncouplers (PCP or CCCP, blue and yellow lines, respectively) and of 200 mM KCl after ATP-Tris addition (red line), but using the BY4742 strain. (C) Effect of 5 mM ATP-Tris in the presence of 10 μ M baflomycin A₁ (violet line) or 10 mM glucose (pink line), and of 200 mM KCl after ATP-Tris addition (red line). Control assay without addition to the spheroplasts is indicated in Figures A, B and C (green line)

Entrance of pyranine to the vacuole in spheroplasts

Pyranine was used as a fluorescent probe to follow the changes of vacuolar pH in spheroplasts. In contrast to intact yeast cells (Calahorra *et al.*,

1998), in spheroplasts, electroporation was not necessary to introduce pyranine into the vacuole. In the experiment with La Azteca strain, it was observed that pyranine freely entered the plasma membrane, and after incubation with Mg-ATP it was concentrated in the vacuole (Figure 4A). In the absence

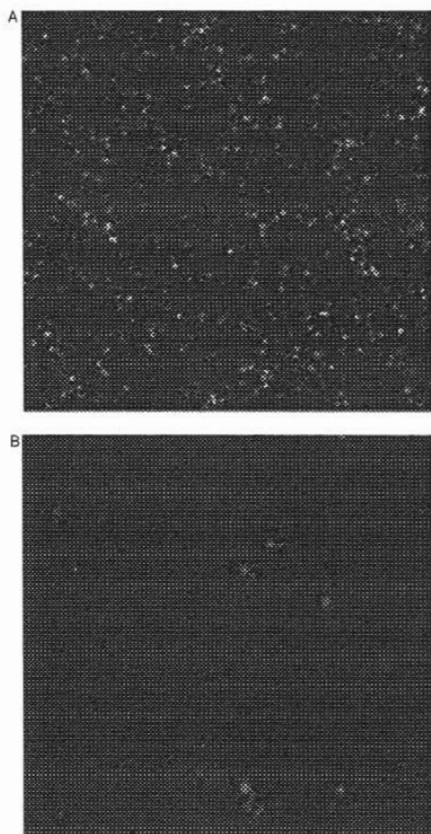


Figure 4. Confocal microscopy of spheroplasts prepared from La Azteca strain grown to the exponential phase in YPD and starved as indicated in Materials and methods. To incorporate pyranine into the vacuole of spheroplasts, 1 mg spheroplast protein was incubated for 1 h at 30 °C with gentle shaking in 10 mM MES-TEA (pH 6.0), 1.35 M sorbitol, 0.1% BSA (Buffer B), with 50 μ M sodium vanadate and 3 μ M pyranine, in the presence (A) or absence (B) of 5 mM Mg-ATP (see Materials and methods). Spheroplasts were centrifuged and washed three times and resuspended in buffer B. Confocal images were obtained as described in Materials and methods

of Mg-ATP no uptake of pyranine into the vacuole was observed (Figure 4B). It was also observed that bafilomycin A_1 prevented the entrance of pyranine and the same phenomenon was observed with

CCCP (not shown). These results showed that the entrance of pyranine into the vacuole depends on the V-ATPase activity and the electrochemical potential of its membrane. Similar results were obtained with the BY4742 strain (not shown).

Vacuolar pH on spheroplasts and isolated vacuoles

Having found that the addition of K^+ to spheroplasts did not produce any change of the membrane potential, but also that the cation entered the organelle, the possible existence of a K^+/H^+ exchange system was explored by analyzing the effects of KCl on the internal pH of the vacuole. Figure 5A shows the vacuolar pH response

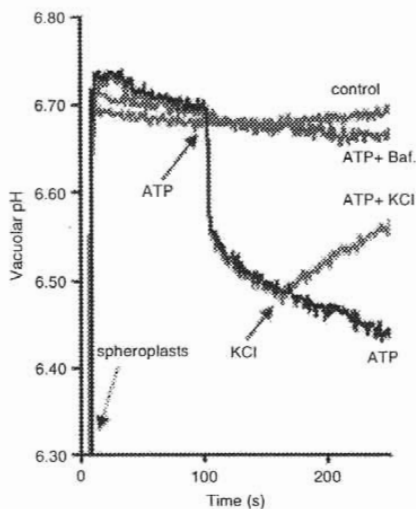


Figure 5. Changes of the internal vacuolar pH, effect of Mg-ATP. Spheroplasts were prepared from yeast (La Azteca strain) grown to the exponential phase in YPD and starved (see Materials and methods). Incorporation of pyranine into the vacuole of spheroplasts was performed as indicated in Figure 4. Spheroplasts with pyranine in the vacuole were incubated in 10 mM MES-TEA (pH 6.5), 1.35 M sorbitol and 5 mM $MgSO_4$. The tracings were started with 1 mg spheroplast protein. Where indicated, 5 mM ATP-Tris in the presence (violet line) or absence of 10 μ M bafilomycin A_1 (black line), and 200 mM KCl (red line) were added. Changes of fluorescence were recorded at 460–520 nm and the pH was calculated according to Peña *et al.* (1995) (see Materials and methods). Control without any addition to the spheroplasts is indicated (green line)

to ATP addition with La Azteca strain. The addition of Mg-ATP produced a pH decrease. In the presence of Mg-ATP and bafilomycin A₁, only a slight response of the vacuolar pH was observed. It was also observed that the addition of 200 mM KCl to spheroplasts after Mg-ATP provoked a low vacuolar alkalization.

However, since in the experiments of Figure 5, K⁺ was entering the vacuole in the presence of Mg-ATP, while at the same time the V-ATPase was pumping protons inside, one experiment was carried out in which KCl was added in the absence of ATP and it was found that, in agreement with the existence of a K⁺/H⁺ antiporter, the vacuolar pH increased after the addition of KCl in the absence of Mg-ATP in both strains (Figure 6A, La Azteca; Figure 6B, BY4742). Moreover, the experimental creation of a more favourable gradient for the efflux of protons at an external pH of 6.5 favoured the increase of the vacuolar pH produced by the addition of KCl. It is striking that the effects of K⁺ required a high concentration to produce an important response of the vacuolar pH in spheroplasts (25–200 mM). Similar results were obtained with NaCl (not shown), indicating that both K⁺ and Na⁺ are transported through the same transporter to the vacuole.

In order to verify the existence of a K⁺/H⁺ antiporter in the vacuolar membrane, vacuoles were isolated from spheroplasts from the strains La Azteca and BY4742. In both cases it was possible to introduce pyranine into the vacuoles after incubating with Mg-ATP (see Materials and Methods) and to measure the vacuolar pH. The response of vacuolar pH in isolated vacuoles to different concentrations of KCl was very similar to that of spheroplasts. Figure 6C shows that vacuoles isolated from La Azteca strain required high concentrations of KCl (higher than 50 mM) to show a significant alkalization. The same experiment was performed with different concentrations of NaCl and similar concentrations to those of KCl were required (not shown).

With the aim of further characterizing potassium transport into the vacuoles, the changes of vacuolar pH with other monovalent alkaline cations were analyzed. Two kinds of assays were performed: a) In Figure 7A (La Azteca strain), the response of vacuolar pH in spheroplasts to chloride salts of K⁺, Na⁺, Rb⁺, Li⁺ and Cs⁺ was confirmed by a second further addition of KCl. This second

addition of potassium permitted to confirm the low grade of selectivity for the different cations. b) In Figure 7B (BY4742 strain), a single addition of the different alkaline cations was done and the same pattern of alkalization was observed to that of La Azteca strain. A very similar alkalization pattern was also observed with the five assayed cations in isolated vacuoles of La Azteca strain (not shown). In view of the small differences in the response of the vacuolar pH to all cations, we concluded that the putative K⁺/H⁺ antiporter is nonselective for alkali-metal-cations.

Discussion

In this work, a technique of permeabilized spheroplasts that allowed the study of vacuolar transport is reported. The results demonstrated that our strains (La Azteca and BY4742), only by incubation with zymolyase become permeable in the plasma membrane without the need of a permeabilizing agent, somewhat differently to those of Avéret *et al.* (1998). However, our results were similar to those of Milani *et al.* (2001) who studied Ca²⁺ transport into the vacuole of *Candida parapsilosis* in spheroplasts using only lyticase. Our results indicated a low percentage of broken spheroplasts after zymolyase treatment (15%) and probably more than 80% unbroken spheroplasts (Figure 1). The presence of spheroplasts was confirmed by microscopic observation and by assay of the plasma membrane potential measured with cyanine (Peña *et al.*, 1984) (not shown), which also proved the predominance of permeable spheroplasts in the preparation.

We actually do not know why the sole incubation with zymolyase resulted in the permeabilization of the plasma membrane in the spheroplasts. It is possible that the protease activity of zymolyase (Ovalle *et al.*, 1998) may be acting on the plasma membrane proteins; it has been found that incubation of *Kluyveromyces lactis* with an excess of zymolyase 20T (ICN) (1 g zymolyase/30 g wet weight) results in the degradation of the plasma membrane ATPase, as observed by denaturing electroforesis (J. P. Pardo, personal communication). More studies are required to elucidate the actions of zymolyase on the plasma membrane, its permeabilization and the susceptibility of other strains.

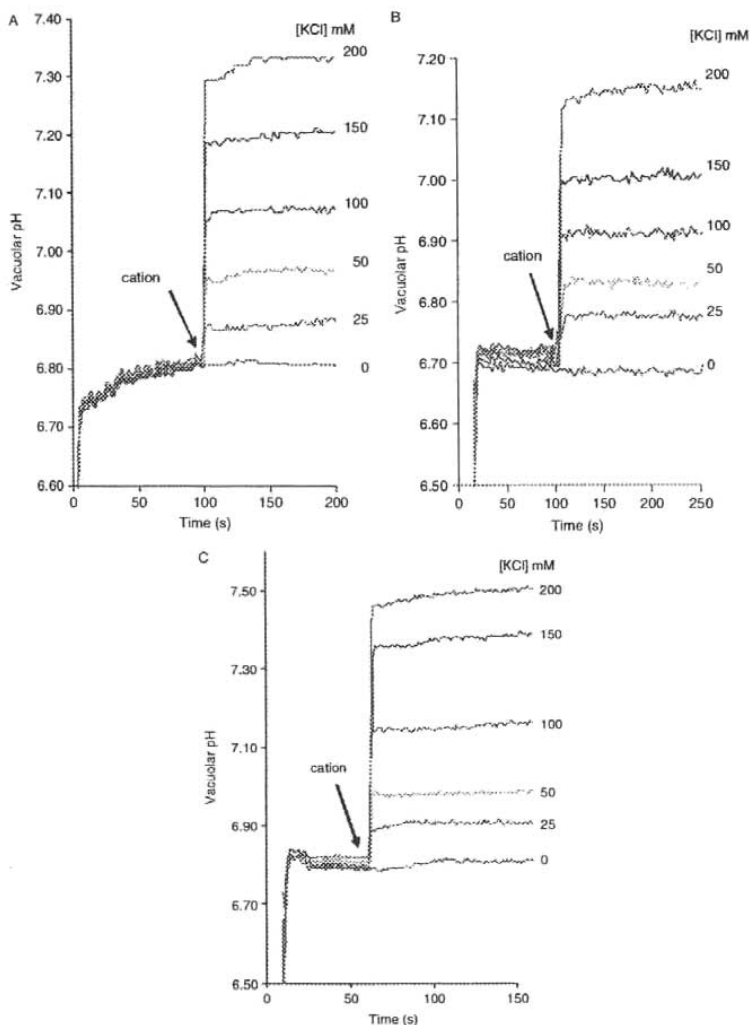


Figure 6. Effect of KCl on the vacuolar pH in spheroplasts and isolated vacuoles in the absence of Mg-ATP. Spheroplasts and vacuoles were prepared from yeast (La Azteca or BY4742 strains) grown to the exponential phase in YPD and starved (see Materials and methods). Pyranine was incorporated into the vacuole of spheroplasts, as indicated in Figure 4. The conditions were the same for the vacuoles (1 mg protein) with the only difference that in the final resuspension in Buffer B did not contain sodium vanadate (see Materials and methods). Spheroplasts containing pyranine inside the vacuole (1 mg) or isolated vacuoles (0.5 mg) with pyranine inside, were incubated in 10 mM MES-TEA (pH 6.5), 1.35 M sorbitol, 5 mM $MgSO_4$. The tracings were started with the addition of spheroplasts or vacuoles. KCl was added at the concentration indicated to: (A) spheroplasts of La Azteca strain, (B) spheroplasts of BY4742 strain and (C) isolated vacuoles of La Azteca strain. Changes of fluorescence were recorded at 460–520 nm and the pH was measured according to Peña *et al.* (1995) (see Materials and methods)

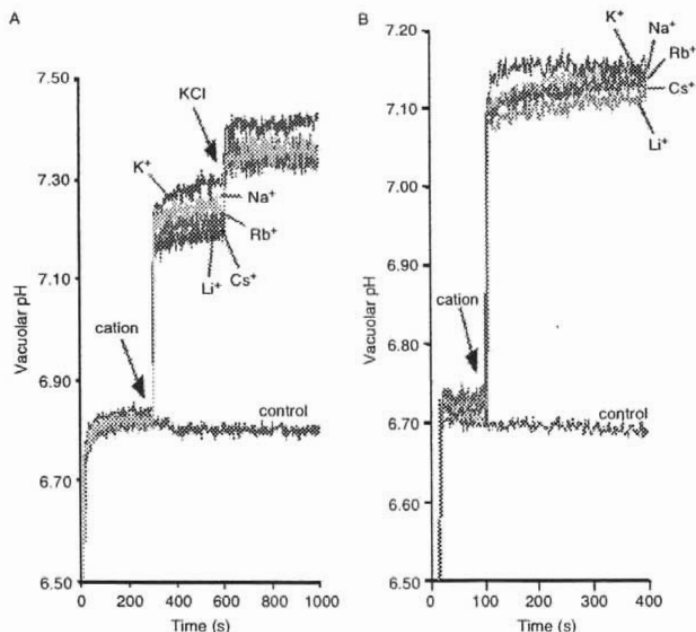


Figure 7. Effect of alkaline-monovalent cations on vacuolar pH in spheroplasts. Conditions were as for Figure 6. Spheroplasts containing pyranine inside the vacuole were incubated in 10 mM MES-TEA (pH 6.5), 1.35 M sorbitol and 5 mM MgSO₄. The tracings were started with 1 mg spheroplast protein. Where indicated (A) 200 mM alkali-monovalent cations (chloride salts of K⁺, Na⁺, Rb⁺, Cs⁺ or Li⁺) (violet, yellow, red, blue and pink lines, respectively), and a second further addition of 200 mM KCl were added to La Azteca strain. (B) In BY4742 strain, 200 mM alkali-monovalent cations (chloride salts of K⁺, Na⁺, Rb⁺, Cs⁺ or Li⁺) were added where indicated. Changes of fluorescence were recorded at 460–520 nm and the pH was measured according to Peña *et al.* (1995) (see Materials and methods). Control assay without addition to the spheroplasts is indicated (green line)

In addition to nucleotide efflux and glucose 6-P dehydrogenase, the apparent free entrance of pyranine without electroporation also indicated the disappearance of the plasma membrane barrier. This was also confirmed by detecting no plasma membrane potential, using a fluorescent cyanine (Peña *et al.*, 1984) (not shown). The results of mitochondrial respiration also confirmed the absence of the plasma membrane barrier to substrates and ADP in spheroplasts, but interestingly enough, while maintaining mitochondrial integrity. The loss of the glycolytic capacity in permeabilized spheroplasts was also important, because it eliminates the possible interference of this pathway on the studies of vacuolar transport. This was

also shown by the failure to observe a substantial reduction of endogenous NAD⁺ by fluorescence at 340–460 nm (Peña *et al.*, 1967) upon the addition of glucose (not shown), which allowed to concluding that the abatement of the glycolytic capacity in spheroplasts of both strains was due to the loss of most of the cytosolic nucleotides, including NAD⁺.

Cytosolic content release from permeabilized spheroplasts and the maintenance of the structural integrity of the vacuole made it possible to get an approximate estimation of the vacuolar content of K⁺. It is important to note: a) the high percentage of potassium maintained in the spheroplasts as compared to intact cells in both strains with or without starvation and b) that spheroplasts from

starved cells lost a higher percentage of K^+ than intact yeast (see Table 3). These results agree with those of Okorokov *et al.* (1980) in the sense that the vacuole is the main storage of potassium ions and other cations in yeast and with the importance of the vacuole in the ionic homeostasis in yeast (Klionsky *et al.*, 1990).

Previous work suggested the existence of a K^+/H^+ antiporter in the vacuole (Calahorra *et al.*, 1998). Our results reinforced the hypothesis about the existence of the mentioned antiporter: a) K^+ uptake was observed in spheroplasts, depending on Mg-ATP, and was inhibited by bafilomycin A_1 and reversed by both CCCP and PCP (Figure 2), b) vacuolar $\Delta\psi$ did not show any change upon the addition of KCl; c) an important increase of vacuolar pH was observed after KCl addition in spheroplasts (Figs. 3C and 6 A) and d) the increase of the vacuolar pH produced by the addition of K^+ was higher in the absence of Mg-ATP; e) data with isolated vacuoles also support the hypothesis of a putative K^+/H^+ antiporter in the vacuolar membrane.

These results suggested the existence of an electroneutral antiporter, performing the uptake of K^+ in exchange for H^+ , but in order to effectively accumulate the alkali cation, protons lost to the cytosol in the exchange have to be replaced by their pumping inside the vacuole by the V-ATPase, making so necessary an electrochemical potential difference of protons as the driving force for net K^+ accumulation.

Two properties of the potassium entrance into the vacuole deserve mention: the high potassium concentration required (50–200 mM) for vacuolar alkalization and the low specificity for K^+ transport into the vacuole. Both properties are different to those observed in the potassium transport through the plasma membrane, which shows a higher selectivity for K^+ over the other monovalent alkali cations and requires very low K^+ concentration for its transport across the plasma membrane of yeast (Calahorra *et al.*, 1998). For aminoacids, transport also shows a difference of two orders of magnitude between the vacuolar and the plasma membrane transporters being higher in the vacuole. Ohsumi and Anraku (1983) explain this because the storage function of the vacuole is adapted to the high cytosolic concentration of the nutrients required to be stored in the vacuole; this

concept appears to be also applicable to potassium transport.

Additional observations showed that this model of permeable spheroplasts may be applied to the study of the transport of other compounds. In fact, vacuolar alkalization was also observed in spheroplasts with pyranine inside the vacuole upon the addition of basic aminoacids (10 mM lysine and arginine) and $50 \mu\text{M Ca}^{2+}$. In contrast, 10 mM glycine did not show any change of vacuolar pH (not shown). The results agree with the described aminoacid/ H^+ antiporter for basic aminoacids and a Ca^{2+}/H^+ vacuolar antiporter, and with the low transport of glycine into the vacuole of yeast (Sato *et al.*, 1984; Ohsumi and Anraku, 1983).

K^+ is a fundamental cation for the yeast and it is stored at a high concentration into the vacuole (Klionsky *et al.*, 1990). Its transport and accumulation requires an important amount of energy, as well as changes of the internal pH of yeast (Peña *et al.*, 1967; Ramírez *et al.*, 1996; Calahorra *et al.*, 1998). Its transport through the plasma membrane has been extensively studied (Wadskog and Adler, 2003); however, little is known about K^+ transport in the vacuole. A vacuolar cation channel has been described (Wada *et al.*, 1987) and Hirata *et al.* (2002) has suggested the existence of a Na^+/H^+ antiporter in the vacuole and studied the role of Nhx1p (Nass *et al.*, 1997). Nhx1p is a Na^+/H^+ antiporter described in the prevacuolar compartments in yeast (Nass *et al.*, 1997; Nass and Rao, 1998; Nass and Rao, 1999), and the possibility has been mentioned that Nhx1p is localized to discrete patches on the vacuoles (Nass and Rao, 1998). For this reason, we first considered to Nhx1p as the more important candidate for being a vacuolar antiporter K^+/H^+ .

In order to confirm this hypothesis, permeabilized spheroplasts of $\Delta nhx1$ mutants, kindly donated by Dr. Rajini Rao, were prepared. Our results showed that: a) the disruption of *NHX1* did not result in the loss of vacuolar K^+ -dependent alkalization and, b) that $\Delta nhx1$ mutants showed the same pattern of vacuolar pH of the wild type strain (BY4742) in presence of K^+ and Na^+ ions (not shown). The observations agree with that of Hirata *et al.* (2002) who found that the system was able to transport K^+ and other monovalent cations and that *NHX1* deletions did not alter the Na^+ transport in vacuolar vesicles. Further studies must be carried out to define if the system reported

in this work is the same described by that Hirata *et al.* (2002).

About the nature of the putative monovalent cation/H⁺ antiporter present in the vacuolar membrane, according to the last review about the eukaryotic sodium/proton exchangers (Brett *et al.*, 2005), no other candidate for this function exists in the *S. cerevisiae* genome. However, it is possible that a unique K⁺/H⁺ antiporter, not coded by *NHX1*, localizes in the vacuole of this organism. In spite of the strong the evidence about the existence of a K⁺/H⁺ antiporter, the conclusive proof would be the discovery of a single protein mediating simultaneously fluxes of protons and potassium in the vacuole of yeast.

Acknowledgements

This work was supported by grants 36070-N from the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, México, and IN223999, and IN202103 from The Universidad Nacional Autónoma de México. We are grateful to Drs. Marietta Tuena, Juan Pablo Pardo and Patricia Kane for their valuable comments to this work, and to Fernando Arroyo and Araceli Patrón for helping to obtain micrographs. We also thank to Dr. Salvador Uribe for the provided material and to Martha Calahorra for technical assistance in handling some instrumental equipment.

References

Avéret N, Fitton V, Bunoust O, Rigoulet M, Guérin B. 1998. Yeast mitochondrial metabolism: from *in vitro* to *in situ* quantitative study. *Mol Cell Biochem* **184**: 67–79.

Brett CL, Donowitz M, Rao R. 2005. Evolutionary origins of eukaryotic sodium/proton exchangers. *Am J Physiol Cell Physiol* **288**: 223–239.

Bryant NJ, Stevens TH. 1998. Vacuole biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*: protein transport pathways to the yeast vacuole. *Microbiol Mol Biol Rev* **62**: 230–247.

Calahorra M, Ramírez J, Clemente MS, Peña A. 1987. Electrochemical potential and ion transport in vesicles of yeast plasma membrane. *Biochim Biophys Acta* **899**: 229–238.

Calahorra M, Martínez GA, Hernández-Cruz A, Peña A. 1998. Influence of monovalent cations on yeast cytoplasmic and vacuolar pH. *Yeast* **14**: 501–515.

Casal M, Blázquez MA, Gamo FJ, Gancedo C, Leão C. 1995. Lack of lactate-proton symport activity in *pep1* mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Lett* **128**: 279–282.

De Hertogh B, Carvajal E, Talla E, *et al.* 2002. Phylogenetic classification of transporters and other membrane proteins from *Saccharomyces cerevisiae*. *Funct Integr Genom* **2**: 154–170.

Elbing K, Larsson C, Bill RM, *et al.* 2004. Role of hexose transport in control of glycolytic flux in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Environ Microbiol* **70**: 5323–5330.

Fiske CH, Subbarow Y. 1925. The colorimetric determination of phosphorus. *J Biol Chem* **66**: 375–400.

Forgac M. 1999. Structure and properties of the vacuolar (H⁺)-ATPases. *J Biol Chem* **274**: 12 951–12 954.

Förster C, Marienfeld S, Wilhelm R, Krämer R. 1998. Organelle purification and selective permeabilization of the plasma membrane: two different approaches to study vacuoles of the filamentous fungus *Ashbya gossypii*. *FEMS Microbiol Lett* **167**: 209–214.

Gowda LR, Joshi MS, Bhat SG. 1988. *In situ* assay of intracellular enzymes of yeast (*Kluyveromyces fragilis*) by digitonin permeabilization of cell membrane. *Anal Biochem* **175**: 531–536.

Guern J, Mathieu Y, Kurkdjian A, *et al.* 1989. Regulation of vacuolar pH of plant cells. II. A ³¹P NMR study of the modifications of vacuolar pH in isolated vacuoles induced by proton pumping and cation/H⁺ exchangers. *Plant Physiol* **89**: 27–36.

Halachmi D, Eilam Y. 1996. Elevated cytosolic free Ca²⁺ concentrations and massive Ca²⁺ accumulation within vacuoles, in yeast lacking PMR1, a homolog of Ca²⁺ ATPase. *FEBS Lett* **392**: 194–200.

Hirata T, Wada Y, Futai M. 2002. Sodium and sulfate ion transport in yeast vacuoles. *J Biochem* **131**: 261–265.

Huber-Wälchli V, Wiemken A. 1979. Differential extraction of soluble pools from cytosol and the vacuoles of yeast (*Candida utilis*) using DEAE-Dextran. *Arch Microbiol* **120**: 141–149.

Joshi MS, Gowda LR, Bhat SG. 1987. Permeabilization of yeast cells (*Kluyveromyces fragilis*) to lactose by cetyltrimethylammonium bromide. *Biotech Lett* **9**: 549–554.

Kane PM. 1995. Disassembly and reassembly of the yeast vacuolar H⁺-ATPase *in vivo*. *J Biol Chem* **270**: 17 025–17 032.

Keenan KA, Weiss RL. 1997. Characterization of vacuolar arginine uptake and amino acid efflux in *Neurospora crassa* using cupric ion to permeabilized the plasma membrane. *Fungal Gen Biol* **22**: 177–190.

Klionsky DJ, Herman PK, Emr SD. 1990. The fungal vacuole: composition, function and biogenesis. *Microbiol Rev* **54**: 266–292.

Leigh RA, Walker RR. 1980. ATPase and acid phosphatase activities associated with vacuoles isolated from storage roots of red beet (*Beta vulgaris* L.). *Planta* **150**: 222–229.

López R, Enríquez E, Peña A. 1999. Effects of weak acids on cation accumulation, ΔpH and Δψ in yeast. *Yeast* **15**: 553–562.

Mellman I, Fuchs R, Helenius A. 1986. Acidification of the endocytic and exocytic pathways. *Annu Rev Biochem* **55**: 663–700.

Milani G, Schreiber A, Vercesi AE. 2001. Ca²⁺ transport into an intracellular acidic compartment of *Candida parapsilosis*. *FEBS Lett* **500**: 80–84.

Nass R, Cunningham KW, Rao R. 1997. Intracellular sequestration of sodium by a novel Na⁺/H⁺ exchanger in yeast is enhanced by mutations in the plasma membrane H⁺-ATPase. Insights into mechanisms of sodium tolerance. *J Biol Chem* **272**: 26 145–26 152.

Nass R, Rao R. 1998. Novel localization of a Na⁺/H⁺ exchanger in a late endosomal compartment of yeast. Implications for vacuole biogenesis. *J Biol Chem* **273**: 21 054–21 060.

Nass R, Rao R. 1999. The yeast endosomal Na⁺/H⁺ exchanger, *Nhx1*, confers osmotolerance following acute hypertonic shock. *Microbiol* **145**: 3221–3228.

- Ohsumi Y, Anraku Y. 1981. Active transport of basic amino acids driven by a proton motive force in vacuolar membrane vesicles of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **256**: 2079–2082.
- Ohsumi Y, Anraku Y. 1983. Calcium transport driven by a proton motive force in vacuolar membrane vesicles of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **258**: 5614–5617.
- Ohsumi Y, Kitamoto K, Anraku Y. 1988. Changes induced in the permeability barrier of the yeast plasma membrane by cupric ion. *J Bacteriol* **170**: 2676–2682.
- Okorokov LA, Lichko LP, Kulaev IS. 1980. Vacuoles: main compartments of potassium, magnesium and phosphate ions in *Saccharomyces carlsbergensis* cells. *J Bacteriol* **144**: 661–665.
- Oliveira DE, Santos Neto ALC, Panek AD. 1981. Permeabilization of yeast for *in situ* determination of α -glucosidase. *Anal Biochem* **113**: 188–192.
- Ovalle R, Lim ST, Holder B, et al. 1998. A spheroplast rate assay for determination of cell wall integrity in yeast. *Yeast* **14**: 1159–1166.
- Peña A, Cinco G, García A, Gómez-Poyou A, Tuena M. 1967. Effects of externally added sodium and potassium ions on the glycolytic sequence of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim Biophys Acta* **148**: 673–682.
- Peña A, Cinco G, Gómez-Poyou A, Tuena M. 1969. Studies on the mechanism of the stimulation of glycolysis and respiration by K^+ in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim Biophys Acta* **180**: 1–8.
- Peña A. 1975. Studies on the mechanism of K^+ transport in yeast. *Arch Biochem Biophys* **167**: 397–407.
- Peña A, Uribe S, Pardo JP, Borbolla M. 1984. The use of a cyanine dye in measuring membrane potential in yeast. *Arch Biochem Biophys* **231**: 217–225.
- 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**: 1017–1022.
- Peterson GL. 1977. A simplification of the protein assay method of Lowry, et al. which is more generally applicable. *Anal Biochem* **83**: 346–356.
- Powell B, Graham LA, Stevens TH. 2000. Molecular characterization of the yeast vacuolar H^+ — ATPase proton pore. *J Biol Chem* **275**: 23 654–23 660.
- Ramírez J, Peña A, Montero M. 1996. H^+/K^+ exchange in reconstituted yeast plasma membrane vesicles. *Biochim Biophys Acta* **1285**: 175–182.
- Rothstein A, Demis C. 1953. The relationship of the cell surface to metabolism. The stimulation of fermentation by extracellular potassium. *Arch Biochem Biophys* **44**: 18–29.
- Sato T, Ohsumi Y, Anraku Y. 1984. Substrate specificities of active transport systems for amino acids in vacuolar-membrane vesicles of *Saccharomyces cerevisiae*. Evidence of seven independent proton/amino acid antiport systems. *J Biol Chem* **259**: 11 505–11 508.
- Serrano R, Gancedo J, Gancedo C. 1973. Assay of yeast enzymes *in situ*. A potential tool in regulation studies. *Eur J Biochem* **34**: 479–482.
- Serrano R. 1980. Effect of ATPase inhibitors on the proton pump of respiratory-deficient yeast. *Eur J Biochem* **105**: 419–424.
- Serrano R, Kielland-Brandt MC, Fink GR. 1986. Yeast plasma membrane ATPase is essential for growth and has homology with $(Na^+ + K^+)$, K^+ - and Ca^{2+} -ATPases. *Nature* **319**: 689–693.
- Sutton DD, Arnow PM, Lampen JO. 1961. Effect of high concentrations of nystatin upon glycolysis and cellular permeability in yeast. *Proc Soc Exp Biol NY* **108**: 107–115.
- Theuvsen APR, Nieuwenhuis BJWM, van de Mortel J, Borst-Pauwels GWFH. 1986. Effect of ethidium bromide and DEAE-dextran on divalent cation accumulation in yeast. Evidence for an ion-selective extrusion pump for divalent cations. *Biochim Biophys Acta* **855**: 383–390.
- Uchida E, Ohsumi Y, Anraku Y. 1988. Purification of the yeast vacuolar membrane H^+ — ATPase and enzymological discrimination of three ATP-driven proton pumps in *Saccharomyces cerevisiae*. *Methods Enzymol* **157**: 544–562.
- Venard R, Brethes D, Giraud MF, et al. 2003. Investigation of the role and mechanism of IF1 and STF1 proteins, twin inhibitory peptides which interact with the yeast mitochondrial ATP synthase. *Biochemistry* **42**: 7626–7636.
- Wada Y, Ohsumi Y, Tanifuji M, Kasai M, Anraku Y. 1987. Vacuolar ion channel of the yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **262**: 17 260–17 263.
- Wadskog I, Adler L. 2003. Ion homeostasis in *Saccharomyces cerevisiae* under NaCl stress. In *Topics in Current Genetics, vol 1, Yeast Stress Responses*, Hohmann S, Mager PWH (eds). Springer-Verlag: Berlin, Heidelberg.