



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**Instituto de Fisiología Celular**

**Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas**

**EL TRANSPORTE DE POTASIO Y LA TRANSICIÓN DE LA  
PERMEABILIDAD EN MITOCONDRIAS AISLADAS DE LA LEVADURA  
*Saccharomyces cerevisiae*.**

**TESIS**

**Para obtener el grado de:**

**DOCTOR EN CIENCIAS BIOMÉDICAS**

**Presenta:**

**Biol. VICENTE CASTREJÓN TÉLLEZ**

**Asesor:**

**DR. SALVADOR URIBE CARVAJAL**

**México, D.F., Diciembre de 2008**



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.

## **DEDICATORIA**

**A mi esposa e hijas, Tere, Ale y Dany, por darme el amor, la fuerza y el apoyo necesarios para seguir adelante en la culminación de la tesis.**

**A Itzel y Samanta, esos pequeños angeles que siempre llevo en mi mente y corazón.**

**La paciencia es un árbol de raíz amarga pero de frutos muy dulces.**

**Proverbio persa**

**Nuestra mayor gloria no está en no haber caído nunca, sino en  
levantarnos cada vez que caemos.**

**Oliver Goldsmith**

**Es necesario esperar aunque la esperanza haya de verse siempre  
frustrada, pues la esperanza misma constituye una dicha, y sus fracasos,  
por frecuentes que sean, son menos horribles que su extinción.**

**Samuel Jonson.**

## **AGRADECIMENTOS**

**A mis padres y hermanos, porque por ellos estoy aquí.**

**Al Dr. Salvador Uribe Carvajal por sus enseñanzas, consejos y paciencia en la realización de este trabajo, gracias.**

**A los miembros de mi comité tutorial: Dr. Salvador Uribe Carvajal, Dr. Antonio Peña Díaz y Dr. Federico Martínez Montes, por su asesoría durante el tiempo de realización de este trabajo.**

**A los doctores encargados de revisar esta tesis: Dra. Marietta Tuena Sangri, Dr. Antonio Peña Díaz, Dra. Xochitl Pérez Martínez, Dr. Froylán Gómez Lagunas, Dr. Edmundo Chávez Cossio, Dra. Cecilia Zazueta Mendizábal, Dr. José de Jesús García Trejo**

**A mis amigos y compañeros de laboratorio, Ramón, Andres, José, Victoriano, Juan Carlos, Manuel, Alma y Lupita, por su apoyo.**

**Este trabajo se realizó en el departamento de Microbiología del Instituto de Fisiología Celular bajo la dirección del Dr. Salvador Uribe Carvajal y del Dr. Antonio Peña Díaz, a quienes agradezco el interés y apoyo que me brindaron.**

## INDICE

<b>TEMA</b>	<b>Página</b>
<b>RESUMEN</b>	<b>7</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>8</b>
<b>ABREVIATURAS</b>	<b>9</b>
<b>I. INTRODUCCIÓN</b>	<b>10</b>
I.1 La levadura.	10
I.2 La mitocondria.	11
I.3 La cadena respiratoria.	13
I.4 Transporte de iones en la mitocondria.	20
I.5 Transporte de potasio en la mitocondria.	21
I.6 La transición de permeabilidad mitocondrial (PT).	24
I.7 El poro de transición de la permeabilidad mitocondrial de mamíferos (mPTP)	25
I.8. Papel de la traslocasa de adenín nucleótidos (ANT) en el PTP.	27
I.9. El canal anionico dependiente de voltaje (VDAC)	28
I.10. El receptor periférico a benzodiazepina (PBR)	28
I.11. La ciclofilina D (Cyp-D)	29
I.12. El acarreador de fosfato (PiC)	29
I.13. Consecuencias de la apertura del poro de transición de la permeabilidad.	31
I.8 El poro de transición de la permeabilidad mitocondrial de levadura (yPTP o YMUC)	31
I.15. Relación entre el poro de transición de la permeabilidad (PTP) y el canal no selectivo de la mitocondria de levadura (YMUC).	34
<b>II. HIPÓTESIS</b>	<b>35</b>
<b>III. OBJETIVOS</b>	<b>35</b>
III.1 Objetivo General	35
III.2 Objetivos Particulares	35
<b>IV. METODOLOGÍA</b>	<b>36</b>
IV.1 Material químico y biológico.	36
IV.2 Medio de cultivo.	36
IV.3 Tratamiento previo de las levaduras.	36
IV.4 Aislamiento de mitocondrias de levaduras.	37

IV.5 Determinación de proteína.	37
IV.6 Oximetría.	37
IV.7 Evaluación del potencial transmembranal con Safranina-O	38
IV.8 Hinchamiento mitocondrial.	38
IV.9 Transporte de $^{86}\text{Rb}^+$ .	38
V. RESULTADOS	40
V.1. El rubidio provoca hinchamiento mitocondrial independientemente de la concentración mitocondrial.	40
V.2. El efecto de fosfato sobre el potencial transmembranal es parcialmente sensible a la concentración mitocondrial.	42
V.3. La captación de rubidio por la mitocondria es estimulada por el fosfato.	43
V.4. En la mitocondria de levadura, el hinchamiento mitocondrial es modulado por quinina y por $\text{Mg}^{++}$ .	45
V.5. La captación de $^{86}\text{Rb}^+$ se inhibe con quinina y $\text{Mg}^{++}$ .	46
V. 6. El $\text{Zn}^{++}$ aumenta la captación de $^{86}\text{Rb}^+$ por mitocondrias de levadura.	47
VI. DISCUSIÓN	49
VII. CONCLUSIONES	53
VIII. PERSPECTIVAS	54
IX. BIBLIOGRAFÍA	55
X. ANEXOS	
X.1. Anexo 1	74
Closure of the yeast mitochondria unspecific channel (YMUC) unmasks a $\text{Mg}^{2+}$ and quinine sensitive $\text{K}^+$ uptake pathway in <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .	
X.2. Anexo 2	75
Potassium collapses the $\Delta\Psi$ in yeast mitochondria while the rate of ATP synthesis is inhibited only partially: modulation by phosphate.	
X.3. Anexo 3	76
Interactions of arsenate, sulfate and phosphate with yeast mitochondria.	
X.4. Anexo 4	77
El papel del potasio durante la isquemia	

## RESUMEN

El potasio ( $K^+$ ) es transportado con alta afinidad por la mitocondria de levadura. Su mecanismo de entrada no ha sido definido por completo. En mamíferos, es transportado hacia la matriz mitocondrial por un uniportador, y liberado por un antiportador  $K^+/H^+$ , regulado por  $Mg^{++}$  o nucleótidos. El canal inespecífico de la mitocondria de levadura (YMUC) puede regularse mediante diferentes concentraciones de Pi. Así, en ausencia de fosfato (Pi), el volumen mitocondrial aumenta (hinchamiento) en presencia de  $K^+$ , indicando una alta permeabilidad al catión. Para estudiar el transporte de  $K^+$  por la mitocondria de levadura, se realizaron dos ensayos: el hinchamiento mitocondrial y la captura de  $^{86}Rb^+$ , que es un análogo radioactivo del  $K^+$ . Se observó que a baja concentración de Pi, el  $K^+$  provoca el abatimiento del potencial transmembranal ( $\Delta\psi$ ), lo cual no se observó a alta concentración de Pi. El hinchamiento mitocondrial se inhibió a alto (4 mM) Pi. En contraste la captación de  $^{86}Rb^+$  se aceleró. Los datos sugieren la existencia de un mecanismo de transporte de  $K^+$  dependiente de energía, que se activa cuando el YMUC se cierra con Pi. El transporte de  $^{86}Rb^+$  y el hinchamiento son sensibles al  $Mg^{++}$  y la quinina. Este transporte es desenmascarado al cerrar el YMUC con 4 mM Pi. Además, el  $Zn^{++}$ , un inhibidor del antiportador  $K^+/H^+$  aumentó la captación de  $^{86}Rb^+$ . Se sugiere que en la mitocondria de levadura el transporte de  $K^+$  es regulado por el potencial transmembranal y que el  $K^+$  entra a la mitocondria por un uniportador y sale por un antiportador con protones.



## ABSTRACT

The monovalent cation Potassium ( $K^+$ ) is transported with high affinity by mitochondria. In yeast, this mechanism has not been exactly defined. In mammals,  $K^+$  is imported to the mitochondrial matrix through a uniporter. It is expelled through an antiporter which is regulated by  $Mg^{++}$  or nucleotides. In yeast, there is a phosphate ( $P_i$ ) sensitive unspecific mitochondrial channel (YMUC). In the absence of  $P_i$ , mitochondria swell when in the presence of  $K^+$ , indicating that the cation permeates into mitochondria.  $K^+$  transport was studied in yeast mitochondria. Two assays were performed: mitochondrial swelling and the uptake of the radioactive  $K^+$  homologue  $^{86}Rb^+$ . At low, but not at high  $P_i$ ,  $K^+$  evoked the drop of the transmembrane potential ( $\Delta\psi$ ). Mitochondrial swelling was inhibited by  $P_i$ , while in contrast, the uptake of  $^{86}Rb^+$  was enhanced. The data suggest the existence of a  $\Delta\psi$ -dependent mechanism of  $K^+$  uptake. YMUC closure by  $P_i$  unmask this uptake. The  $K^+$  uptake mechanism was sensitive to  $Mg^{++}$  and to quinine. The addition of  $Zn^{++}$ , an inhibitor of the mammalian  $K^+/H^+$  antiporter, increased  $^{86}Rb^+$  uptake. It is suggested that in yeast mitochondria, the  $K^+$  concentration is regulated by the transmembrane potential and the uptake is mediated by a uniporter, while the exit occurs through an antiport with  $H^+$ .

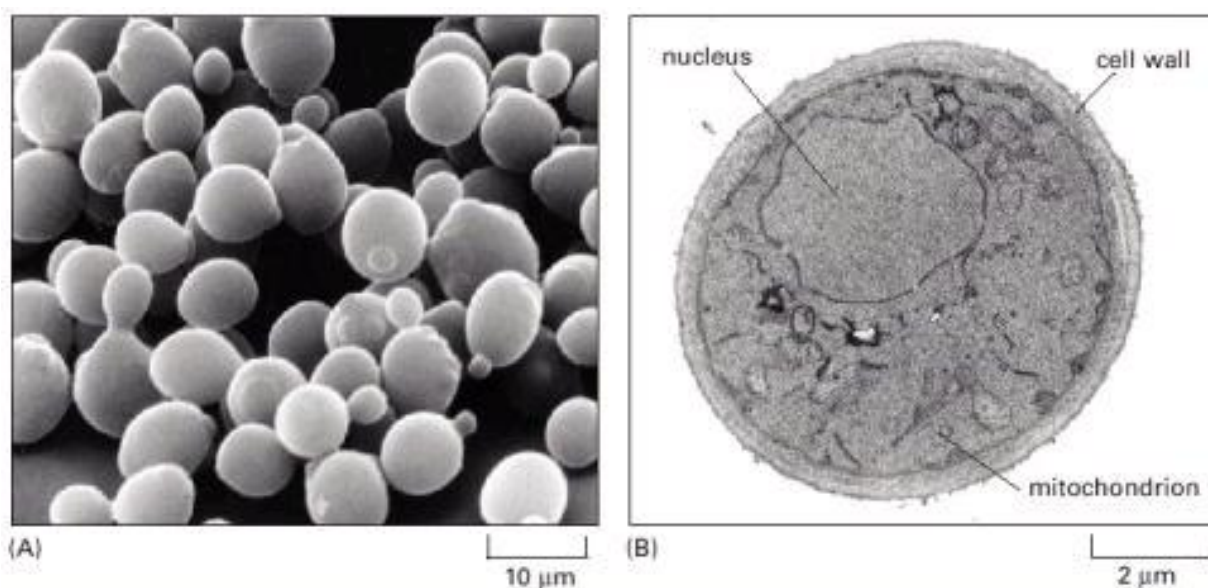
## ABREVIATURAS

BSA	Albúmina sérica bovina
CCCP	Carbonilcianin m-clorofenilhidrazona
DCCD	1,3-Dicicloexilcarbodimida
DNP	2,4-Dinitrofenilhidrazona
EGTA	Etilenglicol-bis( $\beta$ -aminoetileter) N,N,N',N'-tetraacético
F <sub>1</sub> F <sub>0</sub> ATPasa	ATP sintasa mitocondrial
FCCP	Carbonil cianin p-trifluorometilfenil hidrazona
MES	(2-[N-Morfolino] ácido etanosulfónico)
MitoK <sub>ATP</sub>	Canal de K <sup>+</sup> sensible a ATP
TEA	Trietanol amina
YMUC o yPTP	Poros de transición de la permeabilidad de levadura
mPTP	Poros de transición de la permeabilidad de mamíferos
PiC	Acarreador de fosfatos
ANC	Acarreador de adenín nucleótidos
CAT	Carboxiatractilosido
BKA	Ácido bongrécico
CsA	Ciclosporina A
VDAC	Canal aniônico dependiente de voltaje
Cyp D	Ciclofilina D

# I. INTRODUCCIÓN

## I.1 La levadura

Para analizar el funcionamiento interno de la célula eucariote sin enfrentarse a problemas de diferenciación tisular, se utilizan organismos unicelulares simples. Uno de los modelos más populares ha sido la levadura *Saccharomyces cerevisiae* (Fig. 1), la misma que es utilizada para preparar vino o pan (Goffeau y cols., 1996.).



**Figura 1.** Levadura *S. cerevisiae*. **(A)** Micrografía electrónica de un cultivo de levaduras. **(B)** Micrografía electrónica de barrido de un corte de la célula de levadura, donde se observa, el núcleo, las mitocondrias y una delgada pared celular; donada por Ira Herskowitz and Eric Schabatach. (Alberts y cols., 2002).

La levadura *S. cerevisiae* es un organismo unicelular que pertenece al reino de los hongos. Tiene una pared celular, crece fácilmente en medios nutritivos, es relativamente inmóvil y tiene mitocondrias pero no cloroplastos. Puede reproducirse por simple gemación celular o por la unión de dos células haploides (Mewes y cols., 1997). Muchos procesos moleculares están presentes en la levadura, como se demuestra al introducir genes de eucariotes superiores en levadura para el análisis sistemático de su función. Al ser un organismo unicelular con una tasa de crecimiento rápida, la levadura se puede utilizar para estudiar procesos celulares que resultarían muy complicados o costosos en otros organismos (DeRisi y cols., 1997).

## I.2 La Mitocondria

Las mitocondrias son esenciales en todas las células eucariotas que utilizan oxígeno. Fueron identificadas en los años 50s y se les señaló como el lugar donde se lleva a cabo el metabolismo oxidativo (Kennedy y Lehninger, 1949). También se demostró la presencia de proteínas que catalizan reacciones biosintéticas y degradativas, fundamentales para la célula (Dieckmann y cols., 1992). Este organelo tiene su propio genoma, lo cual es una característica importante de su origen endosimbiótico (Grivel y cols., 1999). Sin mitocondrias, las células animales dependerían exclusivamente de la glucólisis anaeróbica para obtener todo el ATP que necesitan. En la mitocondria se completa el metabolismo de los carbohidratos; es decir, el piruvato es transportado al interior mitocondrial para ser oxidado por el oxígeno ( $O_2$ ), a dióxido de carbono ( $CO_2$ ) y agua ( $H_2O$ ). El metabolismo aerobio genera 15 veces más energía que la glucólisis (Rigoulet y cols., 2004).

Las primeras imágenes de la mitocondria fueron mostradas en los años 50s, por microscopía de transmisión electrónica (TEM) (Rasmussen, 1995). Se observó una estructura formada por dos membranas: una membrana limitante externa que rodea a la membrana interna transductora de energía, las que a su vez forman dos compartimentos: a) la matriz rica en proteínas y contenida por la membrana interna y b) el espacio intermembranal localizado entre ambas membranas. Esta imagen ha cambiado radicalmente, porque se ha observado que la membrana interna está compartimentalizada en túbulos o cisternas, los cuales tienen proteínas especializadas y puntos de contacto con la membrana externa (Mannella, 2006).

La membrana externa es topológicamente simple, está formada en un 50 % por una proteína de 30 kDa que forma canales iónicos de alta conductancia. Este canal, reconstituido en bicapas o en liposomas muestra aperturas dependientes de voltaje, pasando de un estado abierto total (650 pS en 150 mM KCl), que es selectivo a aniones, a estados parcialmente abiertos, descritos generalmente como selectivos a cationes, de los cuales el más común tiene una conductancia aproximada a 300 pS, en presencia de moléculas cationicas. Estas características electrofisiológicas del canal,

denominado porina, le dan el nombre de canal aniónico dependiente de voltaje (VDAC) (Pavlov y cols., 2005). La membrana externa varía su forma dependiendo del ambiente en el cual se encuentra la mitocondria. Está topología puede ser tubular o reticulada por estar unida al citoesqueleto de la célula, o circular o esférica, cuando se aísla la mitocondria (Frey y Mannella, 2001).

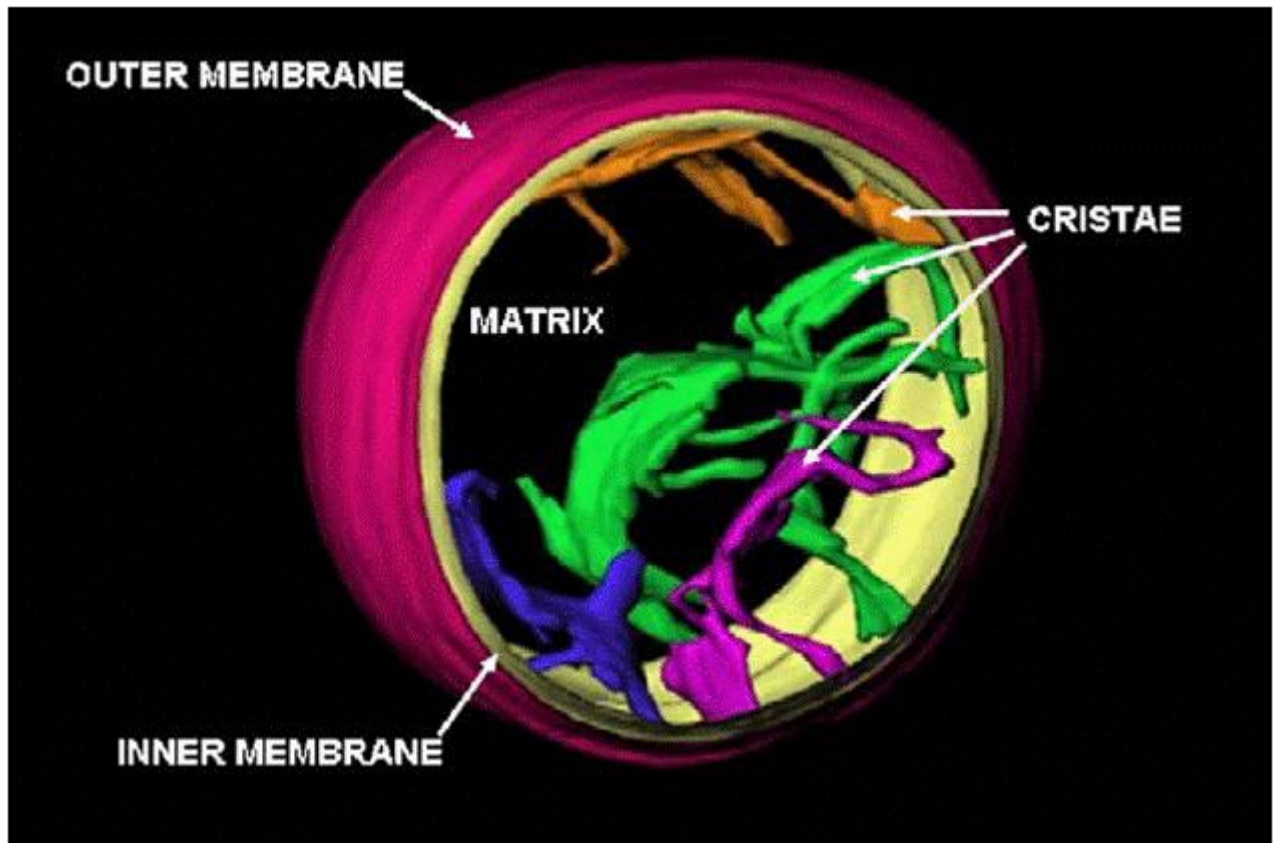


Figura 2. Tomografía crio-electrónica de una mitocondria hidratada y congelada, aislada de hígado de rata. Esta mitocondria tiene un diámetro de 700 nm (Mannella, 2006).

La membrana interna tiene mayor área de superficie que la membrana externa. Forma una serie de invaginaciones, *cristae* o crestas, hacia el interior mitocondrial, formando una estructura llamada “waffle” (Mannella y Frey, 2001). Además, técnicas nuevas, como la termografía crio-electrónica (Mannella y cols., 2001), han mostrado que esas crestas presentan una topología específica y complicada. Esas invaginaciones originan segmentos estrechos parecidos a cuellos o crestas tubulares y segmentos llamados uniones pediculares (*pediculi junctions*) (Perkins y cols., 1997) que usualmente están conectados a la vecindad de la membrana externa, es decir, a la región donde

la membrana interna se adosa a la externa en la periferia de la mitocondria (Mannella, 2006) (Fig. 2).

La formación de las crestas tubulares en la membrana interna, tiene una función muy importante en términos de la eficiencia de la fosforilación oxidativa al proporcionar una alta relación volumen/superficie (Frey y Mannella, 2001). Esta relación pudiera en cierto momento limitar la difusión de iones o sustratos implicados en la síntesis de ATP. Por otro lado, se ha visto que la asociación de las subunidades *e* y *g* de la subunidad  $F_o$  de la ATP sintasa son indispensables para la biogénesis de las crestas mitocondriales. Estas dos subunidades están involucradas en la dimerización/oligomerización de la ATP sintasa mitocondrial en la levadura *S. cerevisiae*, lo cual promueve la formación de los tubos o cuellos crestales (Geneviève y cols., 2004). También se ha visto que la dimerización de la  $F_1F_o$  sintasa tiene un papel importante en la morfología de las crestas de la membrana interna mitocondrial, y que la pérdida de la dimerización causa un cambio en la forma de las crestas, que se deforman y quedan como una serie de capas concéntricas parecidas a una “cebolla” (Paumard y cols., 2002; García y cols., 2006).

Hackenbrock (1966) definió dos estados morfológicos de las mitocondrias fijadas químicamente, el *condensado* y el *ortodoxo*, que difieren entre sí principalmente por el estado de expansión o contracción de la matriz y de los espacios intercrestales. El análisis tridimensional indica que las crestas en el estado ortodoxo (matriz expandida), tienden a ser tubos o lamelas planas y cortas con una o dos aperturas o uniones en la periferia de la membrana interna mitocondrial mientras que, en el estado condensado (matriz compacta), la membrana tiene grandes compartimentos internos con múltiples conexiones tubulares, con la región periférica de la membrana y entre ellas, y asociada a la respiración activa mitocondrial (Mannella, 2006).

### **I.3 La cadena respiratoria**

La cadena de transporte de electrones consiste de cuatro complejos enzimáticos: Complejo I o NADH:ubiquinona oxidoreductasa, Complejo II o succinato:ubiquinona oxidoreductasa, Complejo III o citocromo  $bc_1$  y el

Complejo IV o citocromo *c* oxidasa (Hatefi, 1985). Estos complejos están localizados en la membrana interna mitocondrial. Esos complejos están conectados electrónicamente por pequeños componentes, la ubiquinona y el citocromo *c*. Los complejos respiratorios tienen en común la función de transferir electrones al oxígeno de manera acoplada a la traslocación de protones a través de la membrana interna mitocondrial. La traslocación de protones genera un gradiente electroquímico que es utilizado para sintetizar ATP por la ATP sintasa (Mitchell, 1961). Desde la primera purificación de los complejos respiratorios (Hatefi, 1985), se han realizado diferentes estudios para dilucidar la organización molecular de la cadena respiratoria, de los cuales dos modelos han sido propuestos. En el primero o estado fluido, los componentes de la cadena respiratoria difunden libres e independientes en el plano de la membrana y la transferencia de electrones entre ellos se lleva a cabo por colisiones al difundir por la membrana (Gupte y cols., 1984). Este modelo es apoyado por el hecho de que los cinco complejos enzimáticos han sido purificados en forma fisiológicamente activa (Hackenbrock y cols., 1986). En el segundo modelo, o estado sólido, los componentes de la cadena respiratoria están interaccionando entre sí, formando estructuras macromoleculares o supercomplejos llamados respirasomas (Wittig y cols., 2006; Boumans y cols., 1998). Este concepto es apoyado porque en diferentes procesos de purificación se han identificado y caracterizado diferentes supercomplejos de la cadena respiratoria, como son, el dímero de la ATPasa, el supercomplejo I+III<sub>2</sub>, el supercomplejo III<sub>2</sub>+IV<sub>1-2</sub>, o el supercomplejo I+III<sub>2</sub>+IV<sub>1-2</sub> (Schägger y Pfeiffer, 2000; Eubel y cols., 2003; Krause y cols., 2004; Van Lis y cols., 2003). Incluso, se ha propuesto que los respirasomas, formados por I+III<sub>2</sub>+IV<sub>1-2</sub>, se asocian específicamente por la tetramerización del complejo IV, generando un cordel (string) respiratorio, es decir un ensamble lineal de supercomplejos respiratorios (Wittig y cols., 2006).

**La NADH-deshidrogenasa o complejo I**, es una enzima de gran tamaño que cataliza el primer paso de la cadena de transporte de electrones mitocondrial (Schultz y Chan, 2001). Esta enzima oxida al NADH, transfiriendo electrones a la ubiquinona (Coenzima Q o CoQ), un acarreador de electrones soluble en lípidos. El complejo I está formado por 46 subunidades, dándole una

masa molecular de aproximadamente 1000 kDa (Carroll y cols., 2003). Siete de ellas son producto del genoma mitocondrial, y corresponden a los componentes hidrofóbicos llamados ND1 a ND6 y ND4L (Chomyn y cols., 1985). Está relacionado con la formación del gradiente de protones transmembranal, con una estequiometría de  $4\text{ H}^+/2\text{ e}^-$  (Brandt, 1997), y es considerado uno de los principales sitios de formación de especies reactivas a oxígeno (ROS) junto con el complejo III (Raha y Robinson, 2000).

El complejo I presenta varios grupos prostéticos, un flavín mononucleotido (FMN), que es el punto de entrada de los electrones derivados del NADH (Lenaz y cols., 2006), esos electrones son transferidos a los llamados, centros hierro-azufre. Enzimas de diferentes fuentes, tienen diferente número de centros hierro-azufre, de los cuales varios tienen el mismo potencial y se denominan centros "isopotenciales". Sólo dos de esos centros tienen diferentes características, el N1a, formado por  $\text{Fe}_2\text{-S}_2$ , que tiene bajo potencial (-370 mV), y el N2, formado por  $\text{Fe}_4\text{S}_4$ , que tiene un alto potencial (entre -150 y -50 mV) y que es el que dona directamente los electrones a la ubiquinona (Lenaz y cols., 2006).

El complejo I es inhibido por más de 60 diferentes tipos de moléculas, desde la rotenona hasta moléculas como insecticidas o acaricidas. Esos inhibidores se agrupan en tres clases principales: La clase I/A (cuyo prototipo es la piericidina A), la clase II/B (cuyo prototipo es la rotenona) y la clase C (cuyo prototipo es la capsaicina) (Esposti, 1998)

A diferencia de las bacterias y mitocondrias de muchos eucariotes, las mitocondrias de la levadura *S.cerevisiae*, no tienen un complejo I sensible a rotenona y piericidina (Grandier-Vazeille y cols., 2001). En su lugar tienen al menos dos NADH: ubiquinona-oxidoreductasas insensibles a rotenona, ligadas a la membrana interna mitocondrial. Una de ellas ya ha sido purificada y está constituida por una sola proteína de 57 kDa, codificada por el gen *ND11* (Marres y cols., 1991). También se han identificado otras dos proteínas, codificadas por los genes *NDE1* y *NDE2*, las que fueron encontradas por la homología que presentaron con *ND11* (Small y McAlister, 1998). Estas



proteínas no están acopladas a la traslocación de protones y por lo tanto no participan en la síntesis de ATP (de Vries y Marres, 1987).

**El complejo II (succinato:ubiquinona oxidoreductasa)** es un componente clave del ciclo de Krebs que cataliza la oxidación del succinato a fumarato en la matriz mitocondrial como succinato deshidrogenasa, esa oxidación del succinato esta acoplada a la reducción de la ubiquinona a ubiquinol en la membrana interna mitocondrial como parte de la cadena respiratoria (Xia y cols., 2007; Cortés-Rojo y cols., 2007). Los electrones son transferidos a través de una serie de grupos prostéticos internos, un flavín adenindinucleotodo (FAD), un centro  $Fe_2-S_2$ , un centro  $Fe_4-S_4$ , un centro  $Fe_3-S_4$  y un grupo hemo *b*, que son parte integral del complejo (Hagerhall, 1997). El complejo II, está formado por cuatro subunidades, la proteína de unión a FAD o flavoproteína (68 kDa), la proteína hierro-azufre (29 kDa), y dos proteínas ancladas a la membrana (CybL de 15 kDa y CybS de 11 kDa) que tienen un total de seis cruces transmembranales (Sun y cols., 2005; Huang y cols., 2005). A diferencia del complejo I, la succinato deshidrogenasa no transfiere protones a través de la membrana interna mitocondrial y por lo tanto no participa en la formación del gradiente electroquímico de protones utilizado para la síntesis de ATP (Huo y cols., 2007).

**El citocromo  $bc_1$  o complejo III**, es una enzima de membrana homodimérica, donde cada monómero está formado por 10 a 11 subunidades. Dentro de esas subunidades, siempre se encuentran presentes, sin importar el organismo, tres centros redox o subunidades catalíticas altamente conservadas, los cuales son, el citocromo *b*, que tiene dos grupos hemo tipo *b*, el citocromo  $c_1$ , que tiene un grupo hemo tipo *c*, y una proteína ISP, que tiene un centro hierro-azufre ( $Fe_2-S_2$ ) tipo Rieske (Trumpower, 1990; Berry y cols., 2000). Estos centros redox se dividen en dos grupos, de acuerdo a su potencial, el grupo de “alto potencial”, formado por la proteína de Rieske y el citocromo  $c_1$ , y el grupo de “bajo potencial”, formado por los dos grupos hemo *b* (Langley Hunte, 2002) Solo el citocromo *b* está codificado por el DNA mitocondrial; todas las demás proteínas son codificadas en el núcleo (Sidhu y Baettle, 1983).

El citocromo  $bc_1$ , cataliza la transferencia de electrones de un ubiquinol localizado en la membrana a un citocromo  $c$  soluble. Esta reacción redox está acoplada a la traslocación de protones a través de la membrana. Tres sitios de unión enzimáticos participan en la catálisis del complejo III, el sitio quinol oxidasa ( $Q_0$ ), el sitio quinol reductasa ( $Q_i$ ) y un sitio de acoplamiento para el citocromo  $c$  soluble en el citocromo  $c_1$  (Trumpower, 1990).  $Q_0$  se ubica hacia el lado de la membrana cargado positivamente, es decir hacia donde los protones son liberados por la actividad de la enzima;  $Q_i$  se localiza hacia el lado de la membrana cargado negativamente, es decir de donde los protones son tomados durante la reacción; el sitio de acoplamiento para el citocromo  $c$  soluble está localizado en el lado positivo de la membrana, en el citocromo  $c_1$ , representando el acarreador terminal de electrones del complejo  $bc_1$  (Forquer y cols., 2006).

El mecanismo catalítico por el que el citocromo  $bc_1$  coordina las reacciones redox con el bombeo de electrones, se denomina Ciclo Q, el cual describe el camino que siguen los electrones entre los grupos redox del complejo  $bc_1$  y cómo se ligan a la transferencia de protones (Trumpower, 1990). En la reacción, dos electrones se transfieren del ubiquinol, uno a la vez, a través del citocromo  $bc_1$  para reducir dos moléculas de citocromo  $c$  soluble; en este proceso, cuatro protones son translocados de la matriz mitocondrial al espacio intermembranal y dos más son utilizados dentro de la membrana interna en la re-reducción de una ubiquinona a ubiquinol. Esta transferencia de protones provocada por el movimiento de electrones en el citocromo  $bc_1$ , promueve la formación de un gradiente de protones utilizado para la síntesis de ATP (Trumpower, 1990; Forquer y cols., 2006).

**La citocromo  $c$  oxidasa o complejo IV** es la enzima que dona los electrones al oxígeno. El paso final en la transferencia de electrones es catalizado por la familia de oxidasas hemo-cobre, que se encargan de oxidar al citocromo  $c$  y reducir al oxígeno molecular formando agua (Bränden y cols., 2006). Uno de los miembros de la familia de oxidasas hemo-cobre, es la citocromo  $c$  oxidasa ( $CcO$ ) ó citocromo  $aa_3$ , la cual está formada por 13 subunidades en mamíferos (Tsukihara y cols., 1996).

El centro catalítico de la citocromo *c* oxidasa, es similar en procariotes y en eucariotes, y consiste de tres subunidades (I, II, III), donde aproximadamente un 50 % de los aminoácidos son idénticos (Shapleigh y Gennis, 1992). La subunidad I, tiene tres cofactores redox, los grupos hemo *a* y *a*<sub>3</sub> (citocromo *aa*<sub>3</sub>) y el cobre B (Cu<sub>B</sub>) y tiene 12 segmentos transmembranales. La subunidad II tiene cuatro cofactores de cobre A (Cu<sub>A</sub>), y cuenta con dos segmentos transmembranales. La subunidad III está compuesta por siete segmentos transmembranales, arreglados en dos paquetes separados por un surco en forma de V (Bränden y cols., 2006).

La actividad de la citocromo *c* oxidasa resulta en una separación de cargas en la membrana, correspondiente al movimiento de una carga positiva a través de la membrana por cada electrón transferido al oxígeno. En general, por cada electrón transferido al oxígeno, un protón es bombeado a través de la enzima: de esa manera en cada ciclo catalítico se requieren cuatro moléculas de citocromo *c* soluble (cyt *c*<sup>2+</sup><sub>out</sub>), un átomo de oxígeno (O<sub>2</sub>), cuatro H<sup>+</sup> tomados de la matriz para reducir al O<sub>2</sub>, y cuatro H<sup>+</sup> que son translocados de la matriz al espacio intermembranal (Bränden y cols., 2006). Los electrones son donados desde el lado positivo de la membrana por los citocromos *c* solubles hacia un grupo de cobre A, posteriormente hacia un grupo hemo *a* y finalmente al sitio catalítico compuesto por el hemo *a*<sub>3</sub> y un grupo de cobre B; en este sitio catalítico se reduce al oxígeno (Wikström, 2004). Los protones necesarios para la reducción del oxígeno son tomados del lado negativo de la membrana a través de dos rutas de protones, la ruta K y la ruta D. La ruta K es usada para acarrear los protones en la reducción el sitio catalítico; la ruta D aparentemente es usada para la traslocación de protones al espacio intermembranal (Bränden y cols., 2006).

**La F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATP sintasa o complejo V** utiliza el gradiente electroquímico de protones generado por la actividad de la cadena respiratoria para la síntesis de ATP. La ATP sintasa, está formada por el subcomplejo catalítico hidrofílico, llamado F<sub>1</sub>, localizado en la matriz mitocondrial, y el subcomplejo hidrofóbico membranoso, llamado F<sub>0</sub>, que ancla a la enzima en la membrana interna mitocondrial y que participa en el transporte de los protones involucrados en la síntesis de ATP (Pedersen y cols., 2000). Esos dos grandes subcomplejos de

la  $F_1F_0$ -ATP sintasa están formados por múltiples subunidades, en procariotes, el subcomplejo hidrofóbico  $F_0$  ( $ab_2c_{10-14}$ ), y el subcomplejo  $F_1$  ( $\alpha_3\beta_3\gamma\delta\varepsilon$ ), además de dos tallos que los conectan entre sí, uno central que forma al rotor (es giratorio) y uno lateral que fija la subunidad  $F_1$  y forma al estator (es estacionario) (Geneviève y cols., 2004)

La ATP sintasa es un motor rotatorio, que transporta los  $H^+$  de regreso a la matriz mitocondrial, acoplado la liberación de energía del gradiente de  $H^+$  para fosforilar ADP y producir ATP (Mitchell, 1976). Durante la síntesis de ATP, el flujo de protones dirige la rotación de un anillo, formado por 10 a 12 subunidades  $c$ , pertenecientes al subcomplejo  $F_0$ ; este anillo está conectado al tallo central, que tiene las subunidades  $\gamma\delta\varepsilon$  las cuales inducen la rotación y por consecuencia la liberación de una molécula de ATP de las interfaces catalíticas  $\alpha/\beta$  (3) del subcomplejo  $F_1$  (Boyer, 2002). El tallo estator es periférico y conecta las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  del subcomplejo  $F_1$  a las subunidades estáticas del subcomplejo  $F_0$  (Wilkins, 1998). Este mecanismo rotatorio es completamente reversible; es decir, cuando el gradiente de protones transmembranal disminuye, la enzima rota en dirección opuesta uniendo e hidrolizando ATP (García y Capaldi, 1998). Esta enzima es regulada por un poderoso inhibidor de 10 kDa, llamado  $IF_1$ , quien se une al subcomplejo  $F_1$ , con una estequiometría 1:1 (García y cols., 2006).

Recientemente, el análisis bioquímico y estructural ha descubierto que la ATP sintasa interactúa directamente con el acarreador de fosfato (PIC) y el acarreador de adenín nucleótidos (ANC) (Fig. 3). A este supercomplejo, ATP sintasa/PIC/ANT, se le llamó "ATP sintasoma", que está constituido por 17 subunidades (Ko y cols., 2003; Chen y cols., 2004). En términos funcionales, para la mitocondria, este complejo es un mejor sensor fisiológico para la síntesis de ATP, dado que el fosfato y ADP requeridos son transportados directamente al sitio activo de la ATP sintasa.

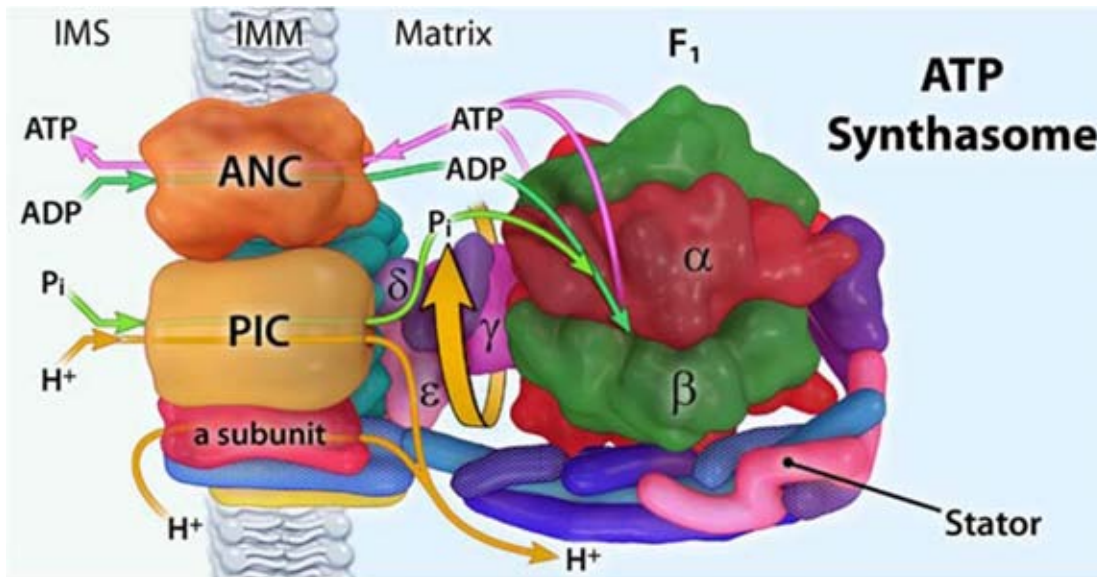


Figura 3. Estructura y función del ATP sintasoma (ATP sintasa/PIC/ANC). Los sitios catalíticos del sintasoma se localizan en la subunidad  $F_1$ , en la interfase de la subunidad a y b. los sitios catalíticos están formados principalmente por aminoácidos de la subunidad b y algunos de la subunidad a. PIC = acarreador de fosfato, ANC = acarreador de adenín nucleótidos (Pedersen, 2007).

#### I.4 Transporte de iones en la mitocondria.

La teoría quimiosmótica (Mitchell, 1961) generó un gran cambio en la forma de interpretar los mecanismos de transporte de iones. Para que un ion sea transportado a través de una membrana, se requieren dos factores: un sistema de transporte, o proteínas que funcionan a través de diferentes mecanismos, los uniportadores, que se encargan de transportar unidireccionalmente a través de membrana, una sola molécula, los simportadores, quienes acoplan el transporte a través de la membrana, de dos o más iones en una misma dirección, y los antiportadores, que transportan en dirección opuesta dos iones (Nicholls y Ferguson, 1992); y un mecanismo impulsor, que puede ser, un gradiente de concentración, un potencial eléctrico, o una combinación de ellos. Cuando estos sistemas de transporte, funcionan y no generan cambios de carga a través de la membrana, se dice entonces, que el sistema es electroneutro, pero si al activarse generan una diferencia de cargas, se conocen como electrogénicos. Si esa activación es capaz, a su vez, de disipar esas cargas, entonces el sistema es electroforético (Nicholls y Ferguson, 1992).

La membrana interna mitocondrial, contiene a las proteínas utilizadas en el transporte de electrones, la síntesis de ATP y todos los acarreadores que transfieren sustratos entre la matriz mitocondrial y el citosol (Garlid y Paucek, 2003). Algunos compuestos orgánicos e inorgánicos pueden, dependiendo de las condiciones, difundir a través de la membrana interna mitocondrial sin requerir de un acarreador específico, pero aquellas moléculas que tienen una carga neta, sí requieren de sistemas de transporte específicos para cruzar a través de la membrana. Se han descrito diversos sistemas de transporte para iones como  $\text{Ca}^{++}$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{Pi}$ ,  $\text{K}^+$  o  $\text{Na}^+$ , los cuales utilizan diferentes mecanismos en su actividad, en estos sistemas de transporte se pueden encontrar a los intercambiadores catión/ $\text{H}^+$ , los uniportadores o los canales. Estos están involucrados en el control de la composición iónica y de la osmolaridad de la mitocondria, así como en dirigir la disipación de la energía libre almacenada en la fuerza protón-motriz, entre otras muchas funciones (Devin y cols., 1997).

### **I.5 Transporte de potasio ( $\text{K}^+$ ) en la mitocondria**

El  $\text{K}^+$  es uno de los cationes más abundantes en la mitocondria; en los mamíferos puede alcanzar una concentración de 100 a 120 mM (Diwan y cols., 1988). Al  $\text{K}^+$  se le atribuyen funciones muy importantes para la mitocondria, tales como, mantener su volumen, evitando el excesivo hinchamiento o la contracción de la matriz, así como, regular la producción de especies reactivas de oxígeno, utilizadas en la señalización celular (Garlid y Paucek, 2003), regular la velocidad de consumo de  $\text{O}_2$  por la cadena respiratoria, o estimular la síntesis de ATP por la  $\text{F}_1\text{-F}_0$  ATP sintetasa en mitocondrias de organismos como *S.cerevisiae* (Uribe y cols., 1991).

El transporte de potasio es catalizado por los sistemas de entrada y salida de  $\text{K}^+$ ,  $\text{H}^+$  y aniones (Fig. 4). El transporte electroquímico de protones formado por la cadena respiratoria, promueve el ingreso de  $\text{K}^+$  a la matriz por difusión ( $\text{K}^+$  leak), y por la activación de un canal de  $\text{K}^+$  sensible a ATP (mito $\text{K}_{\text{ATP}}$ ). Por otro lado, el intercambio de  $\text{K}^+$  por  $\text{H}^+$ , puede alcalinizar la matriz, haciendo que se active la entrada de fosfato ( $\text{Pi}$ ), vía un simportador  $\text{Pi-H}^+$ . La entrada neta de  $\text{K}^+$  a la matriz, genera un obligado hinchamiento mitocondrial. El exceso de  $\text{K}^+$  en la

matriz es eliminado por la actividad de un antiportador  $K^+/H^+$  (Garlid y Paucek, 2003) (Fig. 4).

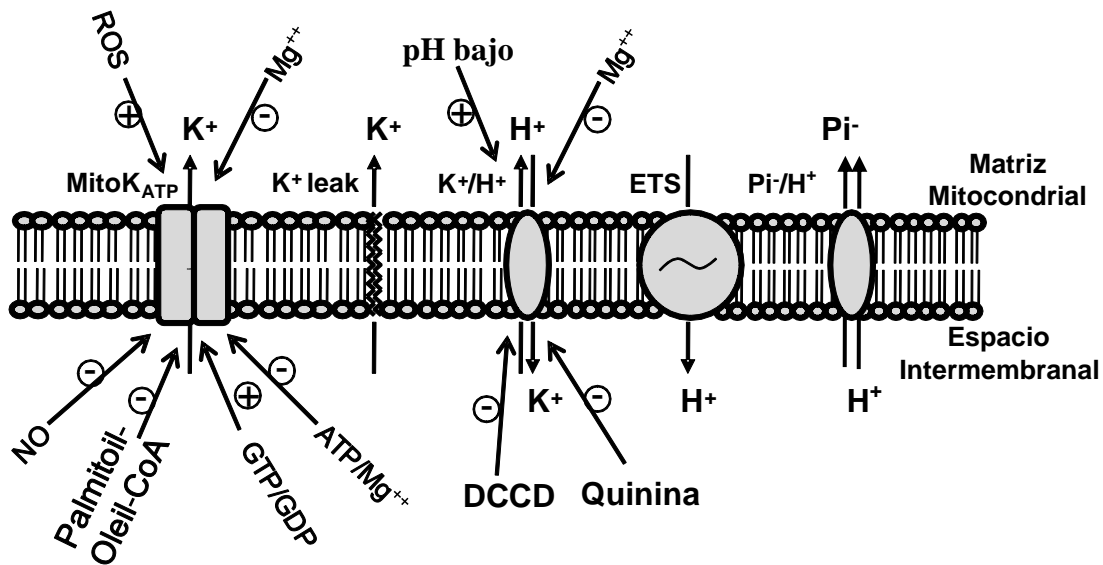


Figura 4. Mecanismos de transporte de  $K^+$  a través de la membrana interna mitocondrial: canal de potasio sensible a ATP (MitoK<sub>ATP</sub>), difusión de potasio ( $K^+$  leak), antiportador  $K^+/H^+$ . Reguladores de los sistemas de transporte para potasio. Oxido nítrico (NO), Especies reactivas de oxígeno (ROS), diciclohexilcarbodiimida (DCCD). ETS, cadena respiratoria (Garlid y Paucek, 2003; Szewczyk y cols., 2006).

La primera evidencia del antiportador  $K^+/H^+$  (Fig. 4) en la mitocondria fue propuesta por Mitchell y Moyle (1969). Antes de los años 80s, se creía que el intercambio  $K^+/H^+$  era mediado por el antiportador  $Na^+/H^+$ , hasta que se describieron dos distintos antiportadores catión/ $H^+$  (Nakashima y Garlid, 1982). El antiportador  $Na^+/H^+$ , selectivo para  $Na^+$ , que no transporta  $K^+$ ,  $Rb^+$  o  $Cs^+$  y el antiportador  $K^+/H^+$ , que transporta  $Na^+$ ,  $K^+$ ,  $Li^+$ ,  $Rb^+$  y  $Cs^+$  (Garlid y Paucek, 2003). Este antiportador es regulado por cationes divalentes desde la matriz mitocondrial, como  $Mn^{++}$ ,  $Ca^{++}$ ,  $Mg^{++}$ ,  $Sr^{++}$ , de los cuales el  $Mg^{++}$  es el principal inhibidor fisiológico del antiportador (Nakashima y cols., 1982). El antiportador  $K^+/H^+$  también es regulado por el cambio de pH: a alta concentración de  $H^+$  se inhibe y a baja concentración se activa (Beavis y Garlid, 1990). Se ha visto que una amplia variedad de aminos anfifílicas también inhiben reversiblemente al antiportador, como fenotiazolinas, antidepresivos, antihistamínicos, los antiarrítmicos y anestésicos locales; dentro de estas moléculas encontramos a la quinina, cuya constante de inhibición es de 6  $\mu M$  (Garlid y cols., 1986). El DCCD

es una prueba no selectiva de proteínas de transporte de iones que reacciona irreversiblemente con carboxilos ocultos en centros hidrofóbicos, esta molécula inhibe irreversiblemente al antiportador, aunque sólo cuando está en su conformación activa (Martin y cols., 1984). Esta propiedad del DCCD ayudó a identificar al antiportador  $K^+/H^+$ , una proteína de 82 kDa (Martin y cols., 1986). El método de hinchamiento, permitió identificar un antiportador  $K^+/H^+$  en mitocondrias de la levadura *S. cerevisiae* con características similares al transportador de mitocondrias de mamíferos (Manon y Guérin, 1992). Las principales diferencias del transportador de la levadura son: (i) el sistema no depende de la depleción de  $Mg^{++}$ , (ii) no es necesario incubarlo en un pH básico para que se observe su actividad; (iii) se inhibe por  $Zn^{++}$  (Manon y Guérin, 1992).

La existencia de un sistema uniportador para  $K^+$  ha sido difícil de establecer en mitocondrias aisladas, debido a la coexistencia de una vía paralela de fuga de  $K^+$  ( $K^+$  leak) (Fig. 4). Diferentes laboratorios se dedicaron a estudiar ese uniportador e identificaron una proteína de 53 - 57 kDa, cuya función es parecida a la descrita para los uniportadores, sin embargo, su regulación no fue descrita (Diwan y cols., 1988). Trabajos posteriores cambiaron la idea acerca del uniportador y se propuso que es un canal de  $K^+$  sensible a ATP (mito $K_{ATP}$ ) (Paucek y cols., 1992). La actividad de este canal es modulada por diferentes nucleótidos (Fig. 4) (Paucek y cols., 1992). La identidad molecular del canal es aún un misterio: estudios inmunológicos identificaron que el poro se forma por dos subunidades, Kir6.1 y Kir6.2 (Lacza y cols., 2003), aunque también se ha propuesto que un complejo de cinco proteínas (incluyendo la succinato deshidrogenasa) es capaz de transportar  $K^+$  con características similares al canal de  $K^+$  sensible a ATP (Ardehali y cols., 2004). Recientemente, se ha implicado al transportador de adenín nucleótidos como parte integral del canal (Kopustinskiene y cols., 2003). La actividad de este canal de potasio es regulada por diferentes fármacos, como el diazóxido y el BMS191095, que funcionan como activadores del canal; o el ácido 5-hidroxi-decanoico, que funciona como un bloqueador (Edwards y Weston, 1990).



## **I.6 La transición de permeabilidad mitocondrial.**

La mitocondria juega un papel muy importante en el desarrollo y sobrevivencia celular, dada su función en la generación de energía metabólica (Mitchell, 1976). La mitocondria también participa en la regulación de los niveles celulares de  $\text{Ca}^{++}$ , tomando  $\text{Ca}^{++}$  del citosol cuando los niveles citosólicos son elevados o liberando  $\text{Ca}^{++}$  cuando los niveles citosólicos son bajos (Bernardi, 1999; Nicholls y Budd, 2000). Por otro lado, cuando el  $\text{Ca}^{++}$  se acumula en el citoplasma durante un período prolongado, la mitocondria participa en el proceso de muerte celular programada porque libera proteínas del espacio intermembranal como el citocromo *c* (*cyt c*), Smac-Diablo, AIF y la endonucleasa G, los cuales a su vez disparan eventos que incluyen la formación de un “apoptosoma” y la activación de caspasas, las cuales activan la muerte celular programada y la degradación nuclear (Martinou y Green, 2001).

La regulación del flujo de iones a través de la mitocondria y particularmente por la membrana interna mitocondrial, es esencial para mantener el gradiente electroquímico y en consecuencia la integridad de la mitocondria (Bernardi, 1999). La membrana posee una impermeabilidad intrínseca a iones y solutos, por lo que una serie de canales y transportadores se encargan de regular el flujo y el volumen mitocondrial (Palmieri, 2004). Sin embargo, se ha visto en mitocondrias aisladas un aumento de su permeabilidad a solutos con masa molecular de aproximadamente 1.5 KDa o menos (Zoratti y Szabo, 1995; Crompton y cols., 2002). Este cambio en la permeabilidad, es llamado transición de la permeabilidad, y fue descrito desde los años 50s. La transición de la permeabilidad puede seguirse por el flujo de agua a través de la membrana, que entra siguiendo la presión osmótica ejercida por la gran concentración de proteína en la matriz mitocondrial y que resulta en un hinchamiento pasivo de la mitocondria.

La transición a la permeabilidad genera dramáticos cambios en la mitocondria: se colapsa el potencial transmembranal, y por lo tanto la síntesis de ATP, se fugan diferentes sustratos, como los respiratorios y los nucleótidos de purina, causando eventualmente la inhibición de la respiración y el desacoplamiento (Forte y Bernardi, 2005). El hinchamiento mitocondrial puede

provenir de un desbalance de agua y solutos entre la matriz y el espacio intermembranal (Pfeiffer y cols., 1995). En células intactas se ha observado que la transición a la permeabilidad puede estar ligeramente activa (ser intermitente), lo cual provoca hinchamiento o cambio en el potencial transmembranal (Szabo y Zoratti, 1991). Se ha observado que la transición a la permeabilidad es un proceso dependiente de  $\text{Ca}^{++}$  (Icha y cols., 1997).

### **1.7 El poro de transición de la permeabilidad mitocondrial de mamíferos (mPTP).**

En mamíferos, la transición de la permeabilidad mitocondrial es consecuencia de la activación de un poro, llamado poro de transición a la permeabilidad (PTP), al cual se le caracteriza como un canal dependiente de voltaje; esa dependencia de voltaje es intrínseca del poro y puede visualizarse utilizando corrientes despolarizantes de  $\text{H}^+$  o  $\text{K}^+$  (Zoratti y Szabo, 1995). Además se ha demostrado la existencia de un canal de alta conductancia (1 nS) dependiente de voltaje, que corresponde con las características del PTP (Forte y Bernardi, 2005). El  $\text{Ca}^{++}$  es el activador más importante del PTP, mientras que la transición abierto-cerrado involucra varios factores fisiológicos y diferentes drogas. También las señales celulares son responsables de modular la apertura del PTP. Por ejemplo, lo afectan directamente las proteínas BCL-2 (el PTP es inhibido por un cociente alto BCL-2/Bax), los niveles de lípidos como la ceramida, y el ácido araquidónico (Bernardi y cols., 2002; Penzo y cols., 2004; Novgorodov y cols., 2005).

Los componentes moleculares del PTP, no han sido elucidados completamente, pero en base a estudios farmacológicos, se ha visto que el PTP está formado por un complejo multiproteico dinámico que posee sitios de contacto entre la membrana interna y externa mitocondriales (Halestrap y Brenner, 2003; Palmieri, 2004). Hasta la fecha se cree que el PTP está compuesto en la membrana interna mitocondrial, por la traslocasa de adenín nucleótidos (ANT) (Halestrap y cols., 1997a), en la membrana externa, por el canal aniónico dependiente de voltaje (VDAC) (Crompton y cols., 1998) y por una proteína reguladora de la matriz, la ciclofilina D (Cyp-D), la cual se une *in vitro* a la VDAC y ANT, formando el PTP (Forte y Bernardi, 2005). El PTP puede ser

regulado por ciclosporina A (CsA) que es una droga inmunosupresiva (Pacher y Hajnoczky, 2001) y por el receptor periférico a benzodiazepinas (McEnery y cols., 1992; Beutner y cols., 1996).

El PTP es fuertemente regulado por diferentes efectores localizados en la matriz mitocondrial, como el  $\text{Ca}^{++}$ , el cual interactúa con el PTP a través de un sitio que puede ser inhibido competitivamente por otros iones como  $\text{Mg}^{++}$ ,  $\text{Sr}^{++}$  y  $\text{Mn}^{++}$ , así como por  $\text{Pi}$ , a través de un mecanismo aún desconocido (Bernardi y cols., 2006). El PTP también es regulado por el estado de oxidación de los nucleótidos de purina (Constantini y cols., 1996).

El pH de la matriz es otro regulador importante del PTP. En mitocondrias de-energizadas, el pH óptimo para la apertura del poro es de 7.4, mientras que la probabilidad de apertura disminuye conforme el pH decrece (Bernardi y cols., 2006). En la membrana interna mitocondrial también existen mecanismos que regulan al PTP. Se ha visto que el gradiente electroquímico formado en la membrana interna mitocondrial, negativo en el interior mitocondrial, estabiliza al PTP en la conformación cerrada (Bernardi, 1992). Se ha postulado la existencia de un sensor de voltaje que se encarga de identificar los cambios de voltaje transmembranal modificando la probabilidad de apertura del PTP (Petronilli y cols., 1993; Petronilli y cols., 2001).

Los aniones anfipáticos, como los ácidos grasos producidos por la fosfolipasa  $A_2$ , favorecen la apertura del PTP a través de un mecanismo aún desconocido; en particular el ácido araquidónico parece jugar un papel clave en las señales apoptóticas dependientes de  $\text{Ca}^{++}$  (Penzo y cols., 2004). Policationes como la espermina, cationes anfipáticos como la esfingosina y trifluoriperazina, y péptidos cargados positivamente inhiben al PTP (Bernardi y cols., 1994). El PTP es regulado por el flujo de electrones que se realiza a través del complejo I de la cadena respiratoria, aumentando la probabilidad de apertura cuando el flujo de electrones es mayor (Fontaine y cols., 1998): este hallazgo implica que el PTP es regulado por las quinonas, posiblemente a través de un sitio de unión específico que afecta el cierre o apertura del PTP (Walter y cols., 2002). Se ha observado que la unión de la ubiquinona 0 (Ub0) o decil-ubiquinona, inhiben la apertura del poro dependiente de  $\text{Ca}^{++}$  (Cesura y cols., 2003).

## **I.8. Papel de la traslocasa de adenín nucleótidos (ANT) en el PTP**

Para los eucariotes, el principal sitio de generación de ATP es la mitocondria, de tal manera que es primordial contar con un sistema a través del cual se transporte el ATP fuera de la mitocondria y se importe ADP. Los dos transportes se llevan a cabo simultáneamente por el acarreador de adenín nucleótidos (ANC) localizado en la membrana interna mitocondrial (Fiore y cols., 1998). El ANC cataliza el intercambio electrogénico de ATP por ADP, generando un gradiente eléctrico a través de la membrana (Halestrap y Brennerb, 2003). El ANC tiene dos inhibidores clásicos, el carboxiatractilósido (CAT) y el ácido bongkrékico (BKA), que se unen al acarreador en una proporción de un inhibidor por dos ANC, formando un complejo de 60kDa. Esta estequiometría sugiere que el ANC existe en forma de dímero (Kaplan, 2001). Estos inhibidores inducen diferentes conformaciones del ANC cuando están presentes, el CAT, que es impermeable a la membrana y se une con ANC del lado citosólico, forma la conformación “c”; mientras que el BKA, que sí es permeable a la membrana y se une con ANC del lado de la matriz, forma la conformación “m” (Klingenberg, 1989).

El PTP está fuertemente regulado por los inhibidores del ANC. En presencia de CAT, se favorece la apertura del PTP, mientras que el BKA favorece el cierre del PTP (Bernardi y cols., 2006). Lo que ha llevado a sugerir que en el PTP participa el ANC (Halestrap y Brenner, 2003). El grupo de Bernardi, propuso que la modulación del PTP es a través de un cambio del potencial de superficie, provocado por la transición del ANC, entre la conformación “c” y “m”, lo cual es capaz de abrir el PTP, a causa de la modulación que ejerce el potencial de membrana sobre el poro (Rottenberg y Marbach, 1990). El ANC, reconstituido en liposomas gigantes, tiene una alta conductancia (insensible a ciclosporina) activada por  $Ca^{++}$ , esta conductancia está regulada por el voltaje, al igual que lo reportado para la dependencia de voltaje del PTP (Brustovetsky y Klingenberg, 1996). Usando cromatografía de afinidad con ciclofilina-D (CyP-D) se purificó el ANC (Crompton y cols., 1998). Por otro lado, existe evidencia de que el ANC no es esencial para la formación del PTP, pues mutantes que carecen del ANC sí exhiben transición a la permeabilidad dependiente de  $Ca^{++}$  y además esta transición es sensible a CsA (Kokoszka y cols., 2004).

### **I.9. El canal anionico dependiente de voltaje (VDAC)**

Estudios recientes en mitoplastos, han demostrado que en la transición a la permeabilidad también participa la membrana externa mitocondrial (Lê-Quôc K y Lê-Quôc D, 1985). Varias líneas de investigación han sugerido que el VDAC participa en la permeabilidad, porque al incorporar VDAC en bicapas de fosfolípidos se forman canales con un poro de 2.5 a 3 nm, cuyas propiedades electrofisiológicas son muy parecidas a las del PTP (Szabo y Zoratti, 1993). Además se ha visto que el VDAC es modulado por NADH,  $\text{Ca}^{++}$  y glutamato, los cuales también modulan al PTP (Bernardi y cols., 2006), así mismo, en cromatografía de afinidad, con CyP-D como ligando, el VDAC puede ser purificado y reconstituido, y es sensible a CsA (Crompton y cols., 1998).

Se han visto “sitios de contacto” entre la membrana interna y externa mitocondrial, los cuales tienen una alta concentración de ANC y VDAC (Beutner y cols., 1996), sugiriendo que el PTP se forma en los sitios de interacción de estas dos membranas. La idea de que el VDAC es un componente del PTP se ha reforzado fuertemente por el estudio de Cesura (2003), quien utilizando ensayos de hinchamiento mitocondrial con diferentes inhibidores del PTP, identificó un inhibidor de alta afinidad (Ro 68-3400), que fue usado para identificar una proteína de 32 kDa correspondiente al VDAC (Cesura y cols., 2003). Se ha visto que la actividad del PTP, es regulada vía sitios sensibles a cationes localizados en el VDAC, por ejemplo, en el PTP existen dos residuos de Glu, localizados en dos diferentes loops del VDAC donde interactúa el  $\text{Ca}^{++}$  (Gutiérrez-Aguilar y cols., 2007).

### **I.10. El receptor periférico a benzodiazepina (PBR)**

El PBR es una proteína de 18 kDa altamente hidrofóbica, localizada en la membrana externa mitocondrial, identificada inicialmente como un sitio de unión a benzodiazepina en tejidos que carecen de receptores para 4-aminobutirato. El PBR es el receptor a benzodiazepina del sistema nervioso central (Anholt y cols., 1986). El PBR se localiza en un amplio número de tejidos, es especialmente abundante en aquellos que producen hormonas esteroideas, como la corteza suprarrenal y las células de Leydig de los testículos (Bribes y cols., 2004). En esas

células, el PBR estimula el transporte de colesterol a la matriz mitocondrial, que es un paso limitante para la síntesis de esteroides (Papadopoulos y cols., 1997). El PBR también se une a porfirinas, incluyendo la protoporfirina IX, la cual es un potente inductor del PTP (Pastorino y cols., 1994). El papel de PBR en la transición a la permeabilidad, se observó por la fuerte asociación que tiene con VDAC y ANC (McEnery y cols., 1992), aunque su expresión en bacterias demostró que la unión de ligandos de alta afinidad al PBR no requiere ni de VDAC ni de ANC. Evidencia adicional de la participación de PBR en el PTP se obtuvo por patch-clamp en mitoplastos, donde se observó alteración de la transición a la permeabilidad por ligandos específicos para PBR (Kinnally y cols., 1993).

### **I.11. La ciclofilina D (Cyp-D)**

Un descubrimiento fundamental en la transición de la permeabilidad fue la identificación de la ciclosporina A (CsA) como inhibidor de alta afinidad del poro (Basso y cols., 2005). El receptor para la CsA es la ciclofilina D (CyP-D), una peptidil-prolil cis-trans isomerasa de la matriz mitocondrial. La Cyp-D cataliza la transformación entre conformaciones de los péptidos adyacentes a los residuos de prolina. La Cyp-D es inhibida por CsA en el mismo margen de concentración que el PTP (Halestrap y Davidson, 1990). Se ha visto que la CyP-D está involucrada en la regulación por  $Ca^{++}$  del PTP, a través de un proceso de alta afinidad (McGuinness y cols., 1990). El resultado más ilustrativo del papel de la CyP-D en el PTP se observó después de la inactivación del gen *Ppif*, el cual codifica para la Cyp-D en ratón. En ausencia de CyP-D, la mitocondria duplica la capacidad de retención de  $Ca^{++}$  de manera semejante a lo que sucede en presencia de CsA (Baines y cols., 2005). De esta manera, se demostró que la CyP-D es un regulador del PTP, dado que la estructura del PTP se altera por la ausencia de CyP-D (Bernardi y cols., 2006).

### **I.12. El acarreador de fosfato (PiC)**

El fosfato (Pi) es un compuesto esencial para el crecimiento y la división celular (Westheimer, 1987), transportado por acarreadores específicos localizados en la membrana interna de la mitocondria (Ferreira y Pedersen,

1993). En la mitocondria de mamíferos, se han descrito dos sistemas de transporte de fosfato; un simportador  $\text{Pi}/\text{H}^+$ , que sirve también como intercambiador  $\text{Pi}/\text{OH}^-$  (Wohlrab, 1986; Wehrle y Pedersen, 1989) y el acarreador  $\text{Pi}/\text{dicarboxilato}$ , que es un antiportador electroneutro (Kramer y Palmieri, 1989). El simportador  $\text{Pi}/\text{H}^+$  puede ser inhibido con reactivos mercuriales, como el p-mercurio-benzoato y el mersalil, y también con N-etilmaleimida (NEM). El transportador de  $\text{Pi}/\text{H}^+$  es extraordinariamente activo. La distribución del fosfato de uno y otro lado de la membrana, depende del gradiente de pH generado a través de la membrana (Nichols, 1987). En mitocondrias de levadura, como *S. cerevisiae*, se ha logrado purificar el simportador de  $\text{Pi}/\text{H}^+$  en forma activa, que corresponde a una proteína de 35 kDa. En contraste con mamíferos, el acarreador  $\text{Pi}/\text{H}^+$  en levadura es insensible a NEM aunque es sensible a compuestos mercuriales (Guérin y cols., 1990).

El Pi modula el transporte de  $\text{Ca}^{++}$  y  $\text{K}^+$  en las mitocondrias de hígado y corazón. Cuando el Pi entra a la mitocondria estimula la entrada de  $\text{Ca}^{++}$  a la matriz donde forma un complejo  $\text{Pi}-\text{Ca}^{++}$  (Zoccarato y Nicholls, 1982). La entrada de  $\text{Ca}^{++}$  a la mitocondria estimula la cadena respiratoria favoreciendo la salida de  $\text{H}^+$  e incrementando el gradiente de pH generado a través de la membrana (acidificando el medio externo) (Zoccarato y Nichols, 1982). En mitocondrias de hígado de rata, se ha visto que el Pi estimula la entrada de  $\text{K}^+$  en presencia de un sustrato que alimente la cadena respiratoria (Jung y cols., 1977). También cuando aumenta el pH en ausencia de Pi, se estimula la entrada de  $\text{K}^+$  a la matriz (Beavis y cols, 1985); al inhibir el intercambiador  $\text{Pi}/\text{OH}^+$  aumenta la entrada de  $\text{K}^+$  dependiente de pH. Si se activa la fosforilación oxidativa, al adicionar ADP en presencia de Pi, se inhibe la entrada de  $\text{K}^+$ , debido probablemente a la reducción del potencial transmembranal (Jung y cols., 1977).

Al investigar cuáles son las proteínas de la membrana interna que se unen al ANC, se sometieron mitocondrias tratadas con CAT a través de una columna de afinidad a óxido de fenilarsina (PAO): se observaron cuatro proteínas además del ANC (Leung y Halestrap, 2008). Una de esas proteínas fue el acarreador de fosfato (PiC), que posiblemente participa en la actividad del PTP (Crompton y Costi, 1988). El papel del PiC en el PTP, se ha observado mediante la adición de análogos de ubiquinona, que bloquean la apertura del

PTP y de N-etil maleimida (NEM), un potente inhibidor de la apertura del PTP a bajas concentraciones (McStay y cols., 2002). Otra evidencia de la participación del PiC como componente formador del poro, es la interacción del PiC, CyP-D y ANC, demostrada por co-inmunoprecipitación (Leung y Halestrap, 2008); también se demostró que este complejo es sensible a CsA (Leung y Halestrap, 2008), lo cual sugiere que el PTP puede estar formado por el complejo PiC, ANC, CyP-D. Además, existe evidencia de que PiC y ANC pueden estar interactuando al asociarse con la ATP sintasa en la formación del “ATP sintasoma” (Chen y cols., 2004).

### **I.13. Consecuencias de la apertura del poro de transición de la permeabilidad**

La consecuencia primaria de la transición a la permeabilidad es la depolarización mitocondrial. Si el periodo de duración de apertura es corto, el PTP puede ser no detectable (Bernardi, 1999). Pero, si la duración de la apertura es larga, existen consecuencias sobre la respiración porque existe pérdida de los sustratos oxidables (Bernardi y cols., 2006), por ejemplo, para los sustratos del complejo I, la apertura del poro está relacionada con la inhibición de la cadena respiratoria y con la pérdida de nucleótidos de purina, y también aumenta la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Bernardi y cols., 2001).

### **I.14. El poro de transición de la permeabilidad mitocondrial de la levadura (yPTP o YMUC).**

La levadura *S.cerevisiae*, se ha convertido en un buen sistema para estudiar la transición a la permeabilidad (Manon y cols., 1998). Y aunque no se ha identificado en la levadura, un sistema de permeabilidad similar al caracterizado en mamíferos, sí se ha encontrado un canal inespecífico de amplia conductancia, denominado poro de transición de la permeabilidad de levadura (yPTP) (Jung y cols., 1997) o canal no selectivo de la mitocondria de levadura (YMUC) (Manon y cols., 1998). La mitocondria de *S. cerevisiae* tiene dos canales de alta conductancia con una conductancia de 400 y 40 pS respectivamente (Ballarin y Sorgato, 1995), de los cuales, uno de ellos constituye al YMUC (Manon y cols., 1998). Al abrirse el YMUC se lleva a cabo un equilibrio de cargas a través



de la membrana (Castrejón y cols., 1997) y se pueden transportar moléculas de hasta 1.1 kDa a través de la membrana (Jung y cols., 1997). Esa permeabilidad se ha caracterizado al ser inducida por nucleótidos a través de la membrana interna, donde el ATP es uno de los principales moduladores (Ballarin y Sorgato, 1995).

La transición de la permeabilidad en la mitocondria se empezó a caracterizar en los años setentas, al estudiarse el transporte de Pi a través de la membrana interna, a la par de esos estudios, se observó que la actividad de la cadena respiratoria provoca un cambio de volumen insensible a mersalil pero sensible a antimicina A (De Chateaubodeau y cols., 1976). En condiciones hipotónicas el YMUC es capaz de transportar moléculas neutras como el manitol y moléculas de polietilén glicol de hasta 1100 Da, cercano al valor encontrado (1.5 kDa) para el PTP en mitocondrias de mamífero (Jung y cols., 1997). Por esta razón, al YMUC se le clasificó como un sistema análogo al poro de transición a la permeabilidad de mamíferos (Bernardi y cols., 1994). En contra de este concepto, se arguye que el YMUC no se activa con  $\text{Ca}^{++}$  y es insensible a ciclosporina A (Manon y Guerin, 1998). Aunque recientemente se ha observado que, dependiendo de la concentración de Pi, el  $\text{Ca}^{++}$ ,  $\text{Mg}^{++}$  y la octilguanidina, promueven el acoplamiento mitocondrial (Pérez-Vázquez y cols., 2003).

El YMUC es capaz de transportar cationes, como  $\text{K}^+$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Li}^+$ , colina; y aniones, como acetato, cloruro, gluconato, y protones (Ballarin y Sorgato, 1995). Este transporte es inducido por nucleótidos como ATP, así como, GTP, CTP y GDP, pero no por ADP. Se ha visto que es sensible a altas concentraciones de Pi (> 1 mM) y a decavanadato, y es insensible a inhibidores del acarreador de adenín nucleótidos (Roucou y cols., 1997).

El YMUC transporta aniones con selectividad diferente (acetato>cloro>gluconato) pero nunca transporta protones (Roucou y cols., 1997). Al contrario, en condiciones energizadas, el YMUC transporta cationes con la siguiente selectividad,  $\text{K}^+>\text{Na}^+\approx\text{Li}^+>\text{colina}$ , pero no transporta protones (Roucou y cols., 1997). Como ya se había mencionado, el YMUC es inhibido con decavanadato y es activado por nucleótidos trifosfato como, ATP, GTP, CTP, y nucleótidos difosfato como el GDP y su análogo GDP- $\beta$ -S (Roucou y cols., 1997).

Es insensible al ácido bongkrékico, inhibidor del acarreador de adenín nucleótidos, que al unirse al acarreador lo mantiene en la configuración “m”. El YMUC, es parcialmente sensible al carboxi-atractilósido, que también inhibe al acarreador y lo mantiene en la conformación llamada “c” (Manon y Guerin, 1998).

En condiciones donde la mitocondria se encuentra oxidando etanol, el YMUC es marcadamente específico a  $K^+$  (Roucou y cols., 1995). También es capaz de desacoplar la fosforilación oxidativa cuando está funcionando, y el mecanismo es inhibido por  $P_i$  (1 – 2 mM) (Beauvoit y cols., 1991).

Aunque se han encontrado evidencias negativas acerca de la participación del VDAC, sobre la transición a la permeabilidad (Roucou y cols., 1997; Baines y cols., 2007), se ha demostrado que aunque el YMUC está presente aún en ausencia de VDAC, se pierde el control que ejercen el  $Ca^{++}$ , la octilguanidina y el vanadato, sobre la apertura del poro, lo cual sugiere que el VDAC sí tiene un efecto regulatorio sobre la transición a la permeabilidad (Gutiérrez-Aguilar y cols., 2007).

Se ha visto que, la adición de ATP induce permeabilidad a  $H^+$  en la mitocondria de levadura, la cual es inhibida por  $P_i$  (Prieto, y cols., 1992). Guérin y cols. (1994), reportaron un canal catiónico inespecífico estimulado por ATP, que es inhibido por ADP,  $P_i$ ,  $Mg^{++}$ ,  $Zn^{++}$  y propanolol. Al medir la fosforilación oxidativa, Roucou y cols. (1995), observaron que a concentraciones fisiológicas de  $K^+$  y altas concentraciones de  $P_i$ , el  $K^+$  entra a la matriz sin desacoplar la fosforilación oxidativa. En este sistema, al inhibir el simportador de  $P_i$ , el  $K^+$  es capaz de inducir desacoplamiento. Esto sugiere que la estimulación de la síntesis de ATP por el  $K^+$  se relaciona con la activación del transporte de  $P_i$ . Roucou y cols. (1995), reportaron que a bajas concentraciones de  $P_i$ , el ATP estimula el transporte de  $K^+$  al interior mitocondrial cuando la mitocondria está respirando. Por otro lado, Prieto y cols., (1995), reportaron que la adición de ATP induce permeabilidad a  $H^+$  en mitocondrias de *S. cerevisiae* y que el  $P_i$  es capaz de inhibir esa permeabilidad, esto sugirió que la eficiencia en la fosforilación puede depender del estado de apertura de un canal iónico (Prieto y cols., 1996).

Se ha demostrado que el PiC de la mitocondria de levadura puede transformarse a un canal aniónico inespecífico al formar un dímero de PiC vía un enlace tiol entre dos cisteínas (Krämer, 1998).

#### **I.15. Relación entre el poro de transición de la permeabilidad (PTP) y el canal no selectivo de la mitocondria de levadura (YMUC).**

Analizar la relación entre ambos mecanismos de transición es importante, dado que puede ayudarnos a entender la posible función real de ellos en los distintos tipos celulares. La primera relación que comparten ambos sistemas es la evidente ausencia de selectividad, ya que ambos sistemas tienen la capacidad de transportar todo tipo de moléculas discriminando solo por el tamaño; otra analogía, se presenta al analizarlos con técnicas de electrofisiología donde se observa que ambos son de naturaleza aniónica (Ballarin y Sorgato, 1995).

Por otro lado, la regulación es muy diferente para ambos canales. El calcio ( $\text{Ca}^{++}$ ) es un factor importante de la apertura del PTP, lo cual no sucede con el YMUC ya que a concentraciones fisiológicas no se ve efecto sobre el YMUC (Jung y cols., 1997). La ciclosporina A, es inhibidor específico del PTP, pero no tiene efecto sobre el YMUC, aún cuando la levadura si tiene una ciclofilina, la cual esta involucrada en el plegamiento de las proteínas codificada por el núcleo (Jung y cols., 1997; Matoushek y cols., 1995). Por otro lado, el Pi que es co-inductor con  $\text{Ca}^{++}$  del PTP, en el YMUC actúa como inhibidor.

No se conoce el significado fisiológico del YMUC, aunque se han propuesto algunas posibles, tales como la regulación del volumen de la matriz mitocondrial y la regulación de la síntesis de ATP (Guérin y cols., 1994; Prieto y cols., 1995; Roucou y cols., 1997). También se ha propuesto que la levadura se beneficia de este canal porque lo utiliza para disipar energía en forma de calor (Dejean y cols., 2000).

## **II. HIPOTESIS**

Existen transportadores específicos e inespecíficos para potasio ( $K^+$ ) en la mitocondria de levadura, por lo tanto, si el poro de transición mitocondrial se cierra, entonces se podrá medir el transporte a través de los transportadores específicos para potasio.

### **III. OBJETIVOS**

#### **III.1 Objetivo General**

Estudiar el transporte de potasio ( $K^+$ ) y su correlación con el estado de permeabilidad en mitocondrias aisladas de la levadura *S. cerevisiae*.

#### **III.2 Objetivos Particulares**

Definir el mecanismo del transporte de  $K^+$  en la mitocondria de levadura con el poro cerrado,

Estudiando el efecto del  $K^+$  sobre el volumen mitocondrial

Midiendo la entrada de  $K^+$  en ausencia y en presencia de  $P_i$

Analizando el efecto del  $Mg^{++}$  y la quinina sobre la entrada de  $K^+$

## IV. METODOLOGÍA

### IV.1 Material químico y biológico.

Se utilizó la levadura comercial de panadero *Saccharomyces cerevisiae* de la Azteca S. A. (México). El manitol, el ácido morfolinoetanosulfónico (MES), el  $\beta$ -nicotinamida adenina dinucleótido (NADH) reducido, la Coenzima Q<sub>2</sub>, el ácido 3-N-morfolinopropanesulfónico (MOPS), el tris-hidroximetilaminometano (Tris-base), la albúmina sérica bovina, el KCl, el RbCl, el MgCl<sub>2</sub>, el NaCl, la Quinina, el Mersalil, el FCCP, el ADP, la emulsión antiespumante, la safranina-O, la antimicina-A y la hexocinasa liofilizada se adquirieron de Sigma Chemical Company, St Louis Mo. (EUA). El <sup>86</sup>RbCl fue adquirido de NEN Life Science Products, Inc. (Boston, MA). El succinato, el ácido fosfórico y el cloruro de potasio, se adquirieron de J. T. Baker, S. A. de C. V. Xalostoc (México). La carboxifluoresceína-AM y el ácido plurónico se adquirieron de Molecular Probes, Eugene, OR (EUA). La Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa liofilizada se adquirió de Boehringer Mannheim, (Alemania). El desacoplante 1799, no fluorescente, fue donado por el Dr. P. G. Heytler, Dupont de Nemours, Wilmington DE (USA). El DEAE Bio-Gel fue de Bio-Rad. El Triton X-100 reducido fue adquirido de Aldrich Chemical Co., y el Triton X-100, 100% puro, fue de Calbiochem Co.

### IV.2 Medio de cultivo.

La levadura se cultivó en un medio completo (DeKlött y cols. 1961) El medio se esterilizó en un autoclave, a 15 libras de presión a 120 °C, durante 20 min.

### IV.3 Tratamiento previo de las levaduras.

Se pesaron 80 gr de levadura (peso húmedo) y se suspendieron en una licuadora comercial con aprox. 500 mL de medio y 8 a 10 gotas de antiespumante; se homogeneizó durante 10 seg a máxima velocidad. La mezcla de levadura se incubó durante 8 horas bajo aireación (3 litros/min) en un cuarto a temperatura constante (30 °C). A las 8 horas de incubación, las levaduras se centrifugaron a 3500 rpm durante 5 min. El botón se resuspendió

en agua destilada y se centrifugó nuevamente. Las levaduras se resuspendieron en un litro de agua destilada y se continuaron incubando a 30 °C durante 15 horas para que consumieran sus sustratos endógenos.

#### **IV.4 Aislamiento de las mitocondrias de levadura.**

Después de la fase de ayuno, las levaduras se centrifugaron a 3500 rpm/ 5 min; el botón se resuspendió con agua destilada y se centrifugó nuevamente a 3500 rpm. Finalmente, se resuspendió en un volumen final de 250 ml de medio isotónico compuesto por manitol 0.6 M, MES 5 mM, BSA 0.1%, pH 6.8 (TEA) a 4 °C.

El rompimiento celular se realizó por agitación en un fraccionador de células Braun, utilizando un vaso fraccionador de 80 ml, al cual se adicionaron perlas de vidrio de 0.45 mm de diámetro hasta la mitad y se completó con la suspensión de levaduras. El pulso de agitación fue de 10 segundos enfriando mediante un flujo continuo de CO<sub>2</sub>. Posteriormente, la suspensión homogeneizada, se sometió a centrifugación diferencial para aislar la fracción mitocondrial (Peña y cols., 1977).

#### **IV.5 Determinación de proteína.**

La concentración de proteína se determinó utilizando el método del biuret (Gornal y cols., 1949), incubando durante 15 minutos a temperatura ambiente. Las muestras se leyeron en un espectrofotómetro Beckman DU-50 a una longitud de onda de 540 nm, utilizando el tubo sin mitocondrias para calibrar el equipo. Para obtener la concentración de proteína total, la absorbencia de las muestras, se interpoló con la obtenida por una curva de concentración de albúmina.

#### **IV.6 Oximetría.**

El consumo de oxígeno se determinó utilizando un electrodo tipo Clark, conectado a un oxímetro (YSI 5300) y a un graficador Kipp and Zonen Delft BV. La sensibilidad del electrodo se ajustó al 100% de la escala del oxímetro de la siguiente manera: en una cámara de vidrio se adicionó el amortiguador (0.6 M

manitol, 5 mM MES, pH. 6.8 (TEA)); Pi 0 a 10 mM pH 6.8 (TEA) y MgCl<sub>2</sub> 0 y 2 mM; como sustrato respiratorio se utilizó 1 µl/ml de ETOH (20 mM). El volumen final se ajustó a 3 ml; se eliminó todo el aire de la cámara. Se obtuvo una basal y se adicionaron las mitocondrias a una concentración final de 0.5 mg de prot/ml. El consumo de oxígeno se registró durante 1 min. (Edo. 4) y se adicionó 160 µM ADP para generar el Edo. 3 de la respiración hasta que se consumió completamente el ADP y el trazo regresó al Edo. 4; posteriormente se adicionó 1 µl/ml del desacoplante 1799 (5 mM) y se midió la velocidad de consumo de oxígeno en estado desacoplado.

#### **IV.7 Evaluación del potencial transmembranal con Safranina-O.**

Se utilizó como indicador del potencial transmembranal el colorante cattiónico safranina-O; los cambios de absorbencia se midieron con ayuda de un espectrofotómetro de doble haz (SLM AMINCO DW2000) en modo dual, utilizando las longitudes de onda de 511 y 533 nm en el monocromador 1 y 2 respectivamente (Äkerman y Wikström, 1979). Se utilizaron celdas de cuarzo de 3 ml con 1 cm de paso de luz. El medio de reacción fue 0.6 mM manitol, 5 mM MES, pH.6.8 (TEA), 1 µl/ml de ETOH (20 mM), 10 µM safranina; 100 µM MgCl<sub>2</sub>; mitocondrias 0.5mg/ml. Se variaron las concentraciones de Pi, pH. 6.8 (TEA) ( 0 a 8 mM) y KCl (0 y 20 mM); el volumen final fue de 2 ml. Todos los experimentos se realizaron a temperatura ambiente (Äkerman y Wikström, 1976).

#### **IV.8 Hinchamiento mitocondrial.**

Las variaciones del volumen mitocondrial se determinaron por la disminución de la absorbencia de la muestra, utilizando un espectrofotómetro Aminco DW200, en modo split a 540 nm. El espectrofotómetro fue equipado con un agitador magnético (Halestrap y Davidson, 1990).

#### **IV.8 Transporte de <sup>86</sup>Rb<sup>+</sup>.**

El transporte de rubidio se determinó preincubando las mitocondrias por 1 minuto en 0.6 M manitol, 5mM MES, pH 6.8 (TEA) más las concentraciones de MgCl<sub>2</sub>, quinina, ZnCl<sub>2</sub> y PO<sub>4</sub> pH 6.8 (TEA), indicadas en las figuras.



Posteriormente, se adicionó  $^{86}\text{RbCl}$  a la concentración final indicada en cada figura. Después del segundo minuto de incubación, se agregó el sustrato, 20 mM de etanol y se tomaron alícuotas de 100  $\mu\text{l}$  a los tiempos indicados. Esas muestras se transfirieron a filtros de nitrocelulosa (poro de 0.45  $\mu\text{m}$ ), previamente humedecidos y montados en un multi-filtro Millipore conectado al vacío. Los filtros se lavaron con buffer de 0.6 M manitol, 5mM MES, 80mM KCl, pH 6.8 (TEA) y se transfirieron a viales de centelleo que contenían 5 ml de líquido de centelleo y la radioactividad se midió en un contador de centelleo Beckman LS6500 utilizando la ventana de fósforo.

## V. RESULTADOS

### V.1. El rubidio provoca hinchamiento mitocondrial, independientemente de la concentración mitocondrial.

En ausencia de fosfato, la mitocondria se hincha en presencia de  $K^+$  (Velours y cols., 1977; Manon y cols., 1998). Para corroborar que el rubidio actúa como un homólogo del potasio y para evaluar si las concentraciones de catión a las que mediríamos la captación de rubidio promueven este hinchamiento mitocondrial, se decidió reevaluar el hinchamiento mitocondrial, en presencia de una alta concentración de proteína mitocondrial (3 mg/ml). Esto es importante porque normalmente las concentraciones de proteína reportadas en la literatura son más bajas que las necesarias para medir el transporte de cationes radiactivos, y a esta concentración se llevaron a cabo la mayoría de los experimentos. Observamos que, de acuerdo con la literatura, en ausencia de fosfato ( $P_i$ ) y en presencia de 20 mM KCl o RbCl, disminuyó la densidad óptica, lo cual indica un hinchamiento mitocondrial (Fig 5).

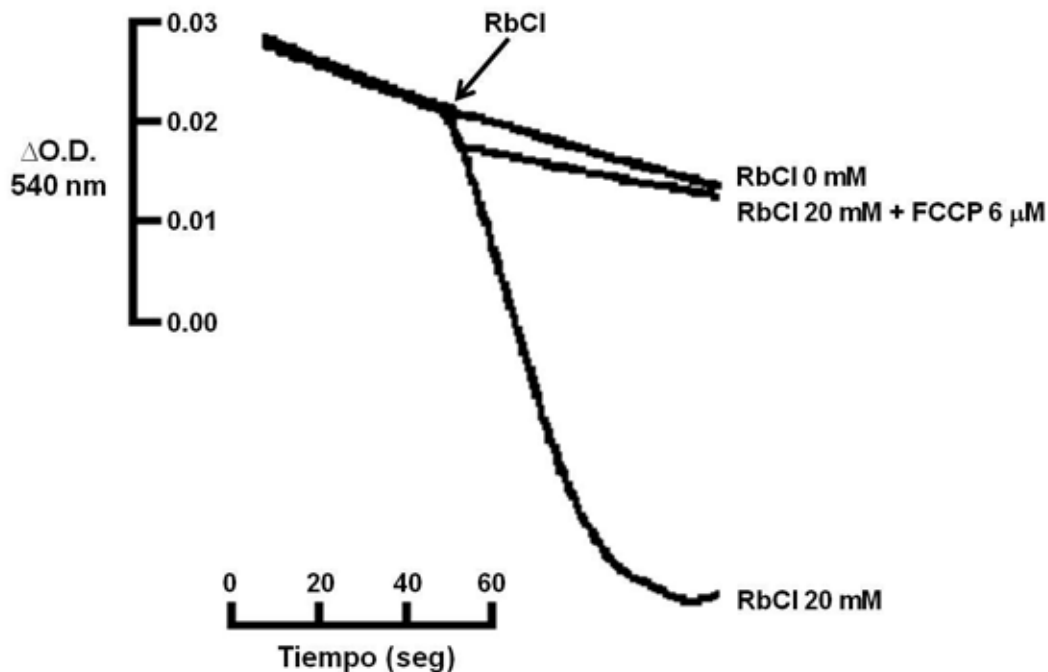


Figura 5. Hinchamiento mitocondrial mediado por rubidio. Mezcla de reacción: 0.6 M manitol, 5 mM MES, pH 6.8 (TEA), 20 mM etanol, 2  $\mu$ l/ml  $H_2O_2$  (10%), mitocondrias 3 mg/ml. Donde se indica se adicionaron: (a) 20 mM RbCl, (b) 20 mM RbCl + 6  $\mu$ M FCCP y (c) 0 mM RbCl. La flecha indica la adición de rubidio. Todos los experimentos se realizaron a temperatura ambiente, a un volumen final de 2 ml.

Posiblemente el hinchamiento fue provocado por el flujo de iones a través del poro inespecífico de la membrana interna mitocondrial, abierto en presencia de concentraciones sub-milimolares de fosfato (Castrejón y cols., 1997 (Apéndice II; Manon y cols., 1998). El hinchamiento observado fue dependiente del gradiente eléctrico de la membrana, porque al agregar el desacoplante FCCP, que abate el potencial transmembranal, el hinchamiento se perdió (Fig. 5).

Al medir el hinchamiento mitocondrial en presencia de 20 mM KCl o RbCl, diferentes concentraciones de Pi inhibieron proporcionalmente el hinchamiento provocado por el KCl o RbCl; el hinchamiento se inhibió casi completamente con 1 mM Pi (Fig. 6). A este respecto, diferentes grupos reportaron que en presencia de 0.4 mM Pi, el YMUC permanece abierto, mientras que a 4 mM Pi el YMUC está cerrado (Manon y Guerin, 1998).

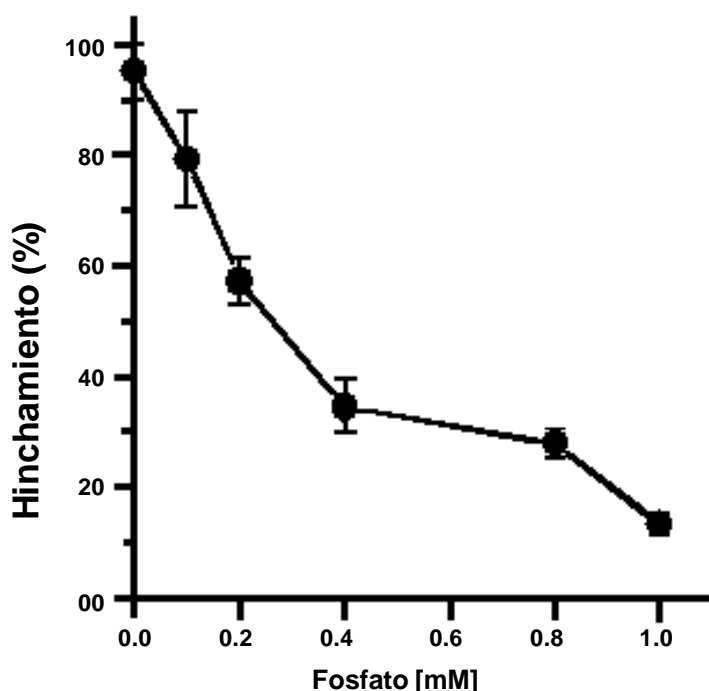


Figura 6. Efecto del fosfato sobre el hinchamiento mediado por Rb<sup>+</sup> en mitocondrias de levadura. Mezcla de reacción: como en la figura 5, excepto por la adición de 20 mM RbCl y como se indica en la figura diferentes concentraciones de fosfato se adicionaron a partir de un stock 0.1 M y 1 M de Pi, pH 6.8 (TEA). Cada punto es promedio de cuatro determinaciones mas menos la desviación estandar.

## V.2. El efecto del fosfato sobre el potencial transmembranal es parcialmente sensible a la concentración mitocondrial.

Con el fin de validar nuestros experimentos de captación de rubidio radiactivo, también se evaluó el posible efecto de la concentración de proteína mitocondrial utilizada, sobre el potencial transmembranal, lo que también es un parámetro que reporta el estado de apertura del poro de transición a la permeabilidad de las mitocondrias de levadura (YMUC). El potencial transmembranal se midió con safranina-O, en presencia de diferentes concentraciones de Pi y de diferentes concentraciones de proteína mitocondrial (Fig 7). En ausencia de Pi, el potencial transmembranal se abatió dentro del primer minuto del experimento, para todas las concentraciones de proteína mitocondrial utilizadas, aunque en altas concentraciones de proteína, sí se observó un incremento inicial en el potencial, conforme aumentó la concentración de proteína de 0.5 a 3 mg/ml (Fig. 7-A).

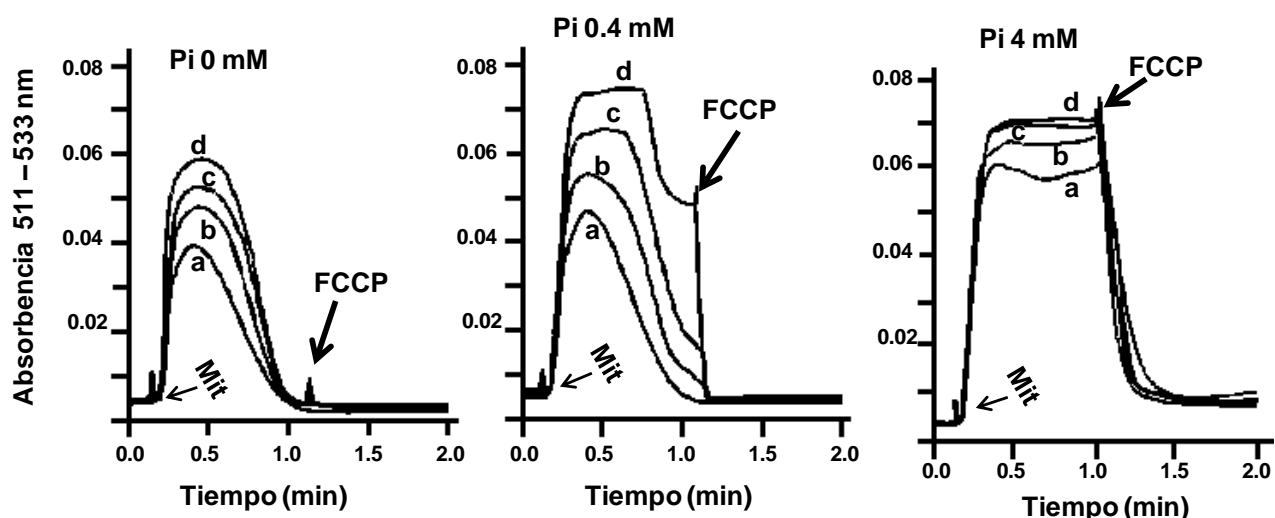


Figura 7. Efecto de la concentración de proteína sobre el potencial transmembranal. Las condiciones experimentales son iguales a la figura 5, excepto por la adición de 10  $\mu$ M de safranina-O y diferentes concentraciones de proteína: (a) 0.5 mg prot./ml, (b) 1 mg prot./ml, (c) 2 mg prot./ml y (d) 3 mg prot./ml. Donde se indica se adicionó la mitocondria o 6  $\mu$ M FCCP. El Pi se adicionó de una solución stock 0.1 M o 1 M pH 6.8 (TEA) a las concentraciones finales de: (A) 0 mM, (B) 0.4 mM y (C) 4 mM. El volumen final fue de 2 ml.

Al realizar el mismo experimento en presencia de 0.4 mM Pi, el aumento de la concentración de proteína mitocondrial resultó en una parcial estabilización del potencial transmembranal. De 0.5 a 2 mg/ml el potencial se abatió durante el primer minuto, pero con 3 mg/ml de proteína mitocondrial, el

potencial disminuyó sólo parcialmente (Fig. 7-B)). Cuando se midió el potencial transmembranal en presencia de 4 mM Pi, éste permaneció elevado y estable a todas las concentraciones de proteína utilizadas (Fig. 7-C). El efecto sobre el potencial transmembranal no fue a causa de la carencia de oxígeno, dado que en todos los experimentos fue agregado peróxido de hidrógeno en cantidad suficiente para mantener constante la concentración de oxígeno. Esto, además fue corroborado, por oximetría utilizando un electrodo tipo Clark, midiendo el consumo de oxígeno por la mitocondria, durante el lapso de tiempo que duraron los diferentes experimentos (Resultados no mostrados).

Los reportes sobre el efecto del fosfato en el potencial transmembranal y el hinchamiento mitocondrial, incluyendo nuestro estudio (Castrejón y cols., 1997; Manon y cols., 1998; Cortés y cols., 2000) son válidos para las condiciones en que se llevó a cabo la captación de rubidio reportada abajo. Es decir, al aumentar la concentración de fosfato, la mitocondria mantiene un potencial elevado y se hace resistente al hinchamiento aún en presencia de concentraciones milimolares de los iones monovalentes potasio y rubidio en el medio.

### **V.3. La captación mitocondrial de rubidio por la mitocondria es estimulada por el fosfato.**

Para caracterizar el efecto del Pi sobre la captación de  $K^+$  por la mitocondria de levadura, se midió la captación de su homólogo radiactivo, el  $^{86}Rb^+$  (Fig. 8). Los experimentos se llevaron a cabo en ausencia de Pi, en presencia de 0.4 mM Pi donde se sabe que existe hinchamiento mitocondrial mediado por  $K^+$ , y a 4 mM Pi donde no hay hinchamiento. Se ha reportado por diferentes grupos que, 0.4 mM Pi el YMUC normalmente está abierto, mientras que a 4 mM Pi el YMUC está cerrado (Velours y cols., 1977; Jung y cols., 1997).

En ausencia de Pi no se detectó captación de  $^{86}Rb^+$  (Fig. 8, trazo a). En contraste, en presencia de 0.4 mM Pi, la mitocondria acumuló aproximadamente 10 nmoles de  $^{86}Rb^+$  (mg proteína)<sup>-1</sup> en dos minutos (Fig. 8, trazo b). Cuando la concentración de Pi fue de 4 mM, la velocidad inicial de

captación de  $^{86}\text{Rb}^+$  fue similar a la observada a 0.4 mM Pi; sin embargo, la captación de  $^{86}\text{Rb}^+$  con 4 mM Pi, disminuyó después de 30 segundos, por lo que a los dos minutos se captaron 5 nmoles de  $^{86}\text{Rb}^+$  (mg proteína) $^{-1}$  por la mitocondria. Sólo después de dos minutos de incubación se observó un pequeño aumento en la captación de rubidio (Fig. 8, trazo c). En todos los experimentos, cuando se agregó el desacoplante FCCP se inhibió la captación de  $^{86}\text{Rb}^+$  (Resultado no mostrado).

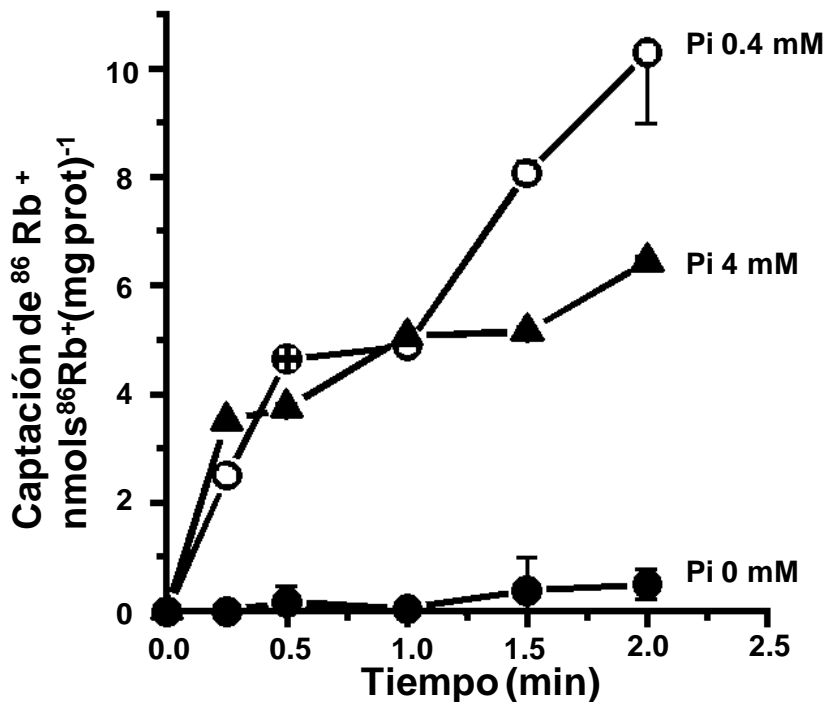


Figura 8. Efecto del Pi sobre la captación de  $^{86}\text{Rb}^+$  por la mitocondria de levadura. Mezcla de reacción: como en la figura 5, excepto por la adición de 20 mM  $^{86}\text{RbCl}$ , 2  $\mu\text{l/ml}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  (10%). Las concentraciones de Pi fueron: (a) 0, (b) 0.4 mM, y (c) 4 mM, adicionadas a partir de un stock 0.1 M y 1 M de Pi, pH 6.8 (TEA). Cada punto es promedio de seis determinaciones. El volumen final 1 ml.

Combinados, los resultados indican que el Pi es capaz de inhibir el hinchamiento mitocondrial provocado por la presencia de  $\text{Rb}^+$ , mientras que, en contraste, este anión promueve la entrada del  $^{86}\text{Rb}^+$ , lo cual implica que no existe una correlación entre ambos parámetros. Además, los experimentos de captación de  $^{86}\text{Rb}^+$ , indican que el sistema por el cual el  $\text{K}^+$  ingresa a la mitocondria, depende de energía y ocurre en presencia de altas concentraciones de Pi, donde se sabe que el YMUC debe de estar cerrado. Por lo tanto, esto sugiere fuertemente que hay sistema de captación de  $\text{K}^+/\text{Rb}^+$  en

la mitocondria de levadura. Este sistema depende del potencial transmembranal y probablemente corresponda a un transportador específico.

#### V.4. En la mitocondria de levadura, el hinchamiento mitocondrial es modulado por quinina y por $Mg^{++}$ .

En mitocondrias de levadura cuyo PTP está cerrado se observó captación de  $^{86}Rb^+$  dependiente de energía. Esto sugiere fuertemente la presencia de un transportador específico. Se sabe que el transportador específico de  $K^+$  de las mitocondrias de mamífero es inhibido por  $Mg^{++}$  o por quinina (Diwan, 1986). Por lo tanto, buscando caracterizar el sistema de transporte de  $K^+/^{86}Rb^+$  de la mitocondria de levadura, decidimos determinar el efecto del  $Mg^{++}$  y la quinina en este sistema. Se observó que el hinchamiento mitocondrial provocado por  $Rb^+$  con 0.4 mM Pi, que ya se había observado, regulado por  $Rb^+$  o  $K^+$ , se inhibió al aumentar la concentración de  $Mg^{++}$ , desde un 50% a 1 mM de  $Mg^{++}$  hasta alcanzar un máximo de inhibición del 70% en concentraciones de  $Mg^{++}$  entre 2 y 8 mM (Fig. 9 A). En presencia de quinina, se observó inhibición del hinchamiento proporcional a la concentración de quinina utilizada, alcanzando un máximo de inhibición del 55% a 0.5 mM quinina (Fig. 9 B).

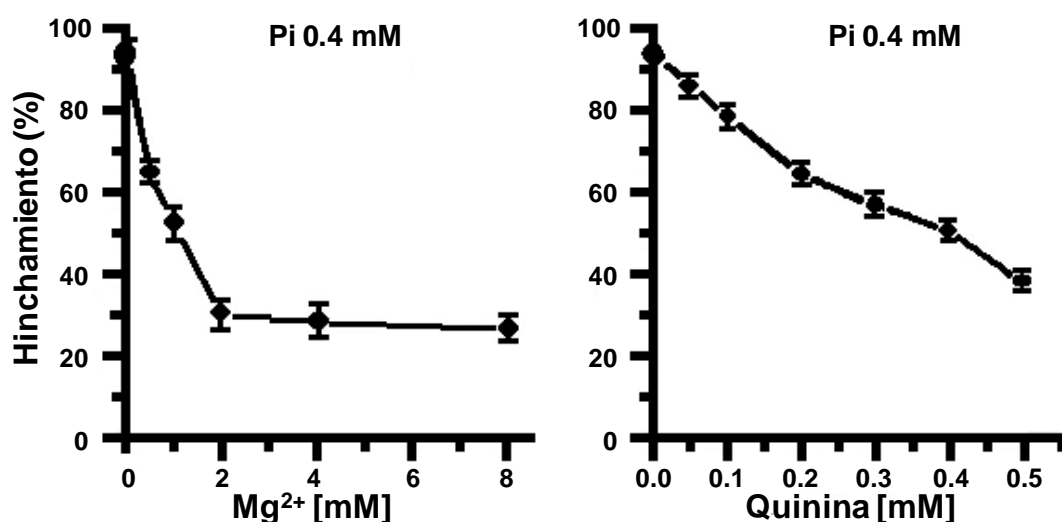


Figura 9. Efecto del  $Mg^{++}$  y quinina sobre el hinchamiento mitocondrial mediado por  $K^+$ . Mezcla de reacción: como en la figura 5, excepto por la adición de 0.4 mM de Pi y (A) diferentes concentraciones de  $Mg^{++}$ , o (B) diferentes concentraciones de quinina. Cada punto es promedio de cuatro determinaciones.

### V.5. La captación de $^{86}\text{Rb}^+$ se inhibe con quinina y $\text{Mg}^{++}$ .

Para correlacionar el efecto entre los experimentos de hinchamiento y la captación del  $\text{Rb}^+$ , se midió la entrada de  $^{86}\text{Rb}^+$  en presencia de 0.4 y 4 mM de Pi y a diferentes concentraciones de  $\text{Mg}^{++}$  o quinina (Fig. 10). La captación de  $^{86}\text{Rb}^+$  disminuye en presencia de concentraciones crecientes de  $\text{Mg}^{++}$ , tanto a 0.4 mM Pi (Fig. 10-A, trazo a), como a 4 mM Pi (Fig. 10-A, trazo b). La máxima inhibición causada por el  $\text{Mg}^{++}$  en ambas concentraciones de Pi fué 2 mM  $\text{Mg}^{++}$ , aunque, con 4 mM de Pi se observó mayor efecto del  $\text{Mg}^{++}$  sobre la captación de  $^{86}\text{Rb}^+$  y en esas condiciones se captaron 1.62 nmoles  $^{86}\text{Rb}^+$  (mg prot) $^{-1}$ , mientras que con 0.4 mM de  $\text{PO}_4$  la captación a 2 mM  $\text{Mg}^{++}$  fue de 4.01 nmoles  $^{86}\text{Rb}^+$  (mg prot) $^{-1}$ . La quinina también inhibió la captación de  $^{86}\text{Rb}^+$ , aunque como ya se esperaba por lo observado en el hinchamiento, la inhibición fue menor en comparación con el  $\text{Mg}^{++}$  (Fig. 10-B). La inhibición de la entrada de  $^{86}\text{Rb}^+$  mediada por quinina fue mayor a 4 mM Pi (Fig. 10-B, trazo b) que a 0.4 mM de Pi (Fig. 10-B, trazo a). La inhibición máxima de la quinina, sobre la entrada de  $^{86}\text{Rb}^+$ , se alcanzó a 0.5 mM para ambas concentraciones, con 4 mM Pi se captaron 2.3 nmoles  $^{86}\text{Rb}^+$  (mg prot) $^{-1}$ ; mientras que con 0.4 mM de Pi se captaron 4.02 nmoles  $^{86}\text{Rb}^+$  (mg prot) $^{-1}$ .

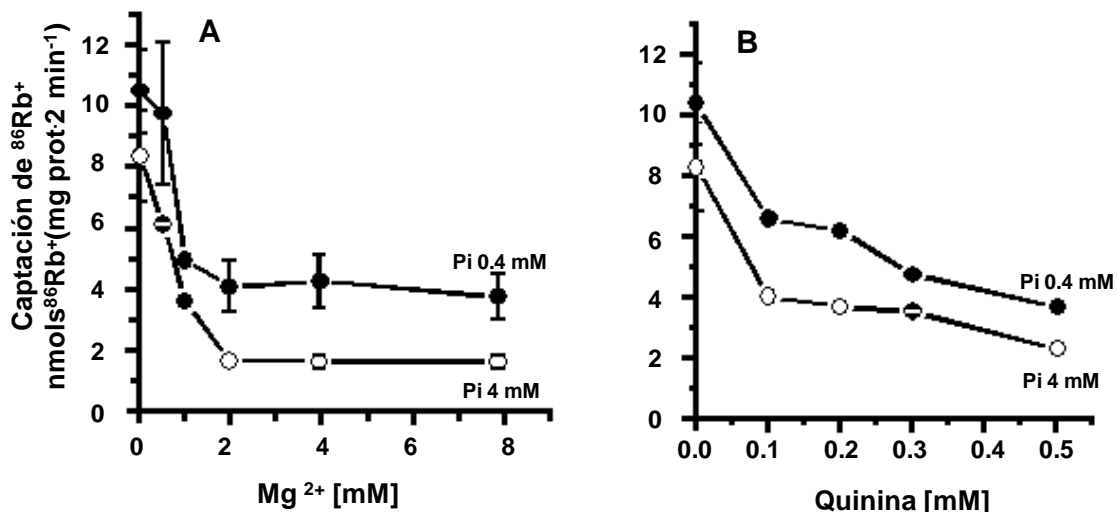


Figura 10. Efecto del  $\text{Mg}^{++}$  o la quinina sobre la captación de  $^{86}\text{Rb}^+$  por la mitocondria de levadura. Mezcla de reacción: como en la figura 8, excepto por (A) la adición de diferentes concentraciones de  $\text{Mg}^{++}$  y (B) la adición de diferentes concentraciones de quinina. Las concentraciones de Pi fueron: (a) 0.4 mM, o (b) 4 mM. Cada punto es promedio de seis determinaciones. El volumen final 1 ml.



En diferentes concentraciones de  $Mg^{++}$  o quinina, se observó una correlación entre los efectos sobre el hinchamiento y la captación de  $^{86}Rb^+$ , indicando que ambas moléculas inhiben la entrada de los cationes monovalentes a la matriz mitocondrial. Los resultados sugieren fuertemente que la mitocondria de levadura tiene un mecanismo de entrada para  $K^+$  muy parecido al observado en mitocondrias de mamíferos superiores; es decir, un acarreador proteico sensible al potencial transmembranal; tal vez un uniportador.

#### **V. 6. El $Zn^{++}$ aumenta la captación de $^{86}Rb^+$ por las mitocondrias de levadura.**

Como fue propuesto originalmente por Mitchell (1961), la formación del gradiente electroquímico requerido para la fosforilación oxidativa, no sólo se utiliza para la síntesis de ATP, sino también para dirigir el transporte de iones, incluida la entrada de  $K^+$ , a la mitocondria y a su vez para regular sus fluctuaciones dependiendo de las necesidades fisiológicas (Mitchell, 1961). Sin embargo, los datos que obtuvimos a partir del hinchamiento y la captación de  $^{86}Rb^+$  por la mitocondria, indican que la captación de  $^{86}Rb^+$  está lejos del equilibrio predicho por la ecuación de Nerst, lo cual podría explicarse porque la velocidad de transporte de  $Rb^+$  es baja, o porque se genera un equilibrio entre la entrada del catión y la salida de éste por un mecanismo indefinido, el cual tal vez sea un antiportador  $K^+/H^+$ , cuya existencia ya ha sido sugerida (Manon y Guerin, 1992) y que en este caso expulsaría al  $^{86}Rb^+$  de la matriz mitocondrial. Para analizar la posible existencia de un mecanismo de salida del  $K^+/Rb^+$ , la captación de  $^{86}Rb^+$  fue medida a 4 mM Pi, en ausencia y en presencia de 0.5 mM  $Zn^{++}$  (Fig. 11) el cual inhibe al posible antiportador  $K^+/H^+$  en la mitocondria de la levadura (Manon y Guérin, 1992, 1995).

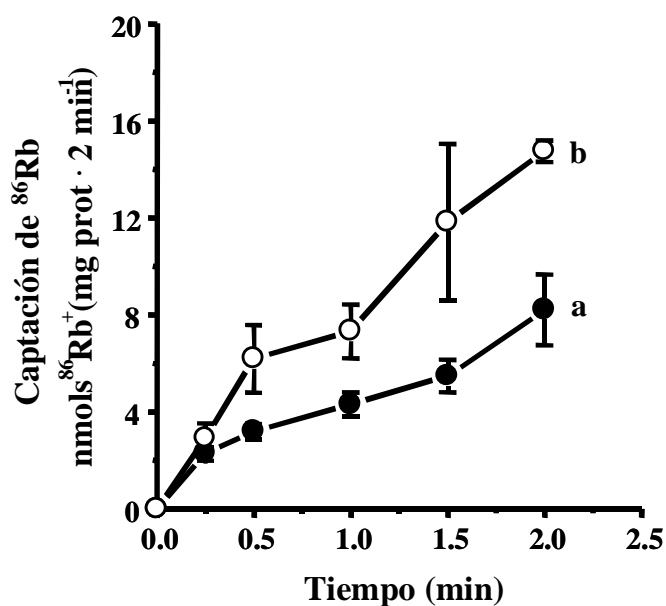


Figura 11. Efecto del  $\text{Zn}^{2+}$  sobre la captación de  $^{86}\text{Rb}^+$  por la mitocondria de levadura. Mezcla de reacción: como en la figura 13, excepto que la concentración de Pi fué 4 mM. La concentración final de  $\text{ZnCl}_2$  fué de (a) 0 y (b) 0.5 mM. Cada punto es promedio de seis determinaciones. Volumen final 1 ml.

La adición de 0.5 mM  $\text{Zn}^{2+}$  en presencia de 4 mM de Pi provocó un incremento en la captación de  $^{86}\text{Rb}^+$ . Lo cual significa que la inhibición del antiportador resultó en un desplazamiento del equilibrio del movimiento de  $^{86}\text{Rb}^+$  en la mitocondria resultando en un aumento en la captación, sugiriendo que este movimiento sobre el sistema de captación del catión se encuentra activo en nuestras condiciones experimentales.

## VI. DISCUSIÓN

En mi proyecto de tesis de licenciatura, determinamos que la conductividad de la membrana de la mitocondria de levadura es regulada por diferentes concentraciones de Pi (Castrejón y cols., 1997; Anexo II). Cuando se incubaba a la mitocondria con bajas concentraciones de Pi la adición de 20 mM  $K^+$  colapsa el potencial transmembranal ( $\Delta\Psi$ ) y abate el control respiratorio hasta un valor de 1.0. Este artículo se incluye aquí como un apéndice.

Los resultados de este trabajo describen dos sistemas diferentes de transporte de  $K^+$  utilizados por la mitocondria de levadura. Estos mecanismos de transporte corresponden al canal inespecífico de la mitocondria de levadura (YMUC) y a un sistema específico de transporte que se detecta cuando el YMUC está cerrado. El segundo sistema de transporte corresponde probablemente, a un sistema uniportador para  $K^+$  y  $Rb^+$  (Fig. 9, trazo c). Otra evidencia que indica la participación de un sistema uniportador electrogénico, fue la influencia que tiene el  $\Delta\Psi$  sobre el transporte de  $^{86}Rb^+$ ; es decir, cuando el  $\Delta\Psi$  se abatió, utilizando un desacoplante, o en ausencia de Pi, no se observó captación de  $^{86}Rb^+$ .

El patrón de hinchamiento mitocondrial no siempre correlacionó con la captación de  $^{86}Rb^+$ . Es decir, a 4 mM Pi no se observó hinchamiento, pero en cambio, la captación de  $^{86}Rb^+$  se estimuló, en especial durante los primeros 30 segundos. La ausencia de hinchamiento sugiere que el sistema de transporte de  $^{86}Rb^+$  es muy específico y que se inhibe porque la mitocondria no permite el movimiento de contraiones. Es decir, el efecto que tiene el Pi sobre el hinchamiento y la inhibición sobre la captación de  $^{86}Rb^+$ , puede deberse a que promueve la impermeabilidad de la membrana a aniones, una vez que el YMUC se cierra.

Como ya se sabe, el  $Mg^{++}$  y la quinina inhiben la captación de los cationes monovalentes en la mitocondria de levadura. Los experimentos con  $Mg^{++}$  y quinina realizados en el trabajo, demuestran que el  $Mg^{++}$  fue mejor inhibidor que la quinina. La sensibilidad del transporte de  $^{86}Rb^+$  al  $Mg^{++}$  y la quinina se evidenció al cerrar el YMUC. Adicionalmente, la captación aumentó

cuando se adicionó  $Zn^{++}$ , que ha sido reportado como un inhibidor del antiportador  $K^+/H^+$  de mitocondrias de levadura. Este efecto sugiere que en ausencia de  $Zn^{++}$ , la captación de  $^{86}Rb^+$  está probablemente contrarrestada por la salida de  $^{86}Rb^+$  a través del antiportador (Villalobo y cols., 1981). La máxima captación fue observada a baja concentración de Pi (0.4 mM), condiciones en las cuales el YMUC permanece abierto, aun cuando no muestre la misma inespecificidad que cuando no hay Pi en el medio. La sensibilidad a  $Mg^{++}$  y quinina, en estas condiciones, sugiere que el sistema de transporte de  $K^+$  en la mitocondria de levadura es cualitativamente similar al reportado para mitocondrias de mamífero (Beavis y cols., 1993).

En mitocondrias de mamífero la apertura del PTP promueve el abatimiento del gradiente electroquímico y la activación de la salida de  $Ca^{++}$ , por lo cual se ha sugerido que una de las funciones fisiológicas del PTP consiste en la detoxificación de  $Ca^{++}$  en las células no programadas para morir (Crompton y Costi, 1990). En la mitocondria de levadura la apertura del YMUC también provoca la depleción del gradiente electroquímico, así como una salida de  $K^+$  y probablemente otros cationes. Ambos resultados sugieren un papel fisiológico general para los poros inespecíficos mitocondriales, que puede ser mantener el equilibrio de los cationes dentro de la mitocondria (Crompton y Costi, 1990). Sin embargo, el hecho de que la levadura tenga un proceso semejante a la apoptosis o no, es aún controvertido y el mantenimiento del equilibrio iónico puede ser una función alternativa de los canales inespecíficos mitocondriales (Manon y cols., 1998).

En ausencia de Pi, condición donde el YMUC está abierto, y no hay potencial transmembranal, se ha observado hinchamiento producido por  $K^+$  (Castrejón y cols., 1997; Manon y Guérin, 1997). Cuando se midió acumulación de  $^{86}Rb^+$  en ausencia de Pi, ésta no fue observada, aún habiendo detectado hinchamiento. Con los resultados observados, podemos proponer dos posibles explicaciones; se sabe que en esas condiciones el YMUC está completamente abierto, lo cual probablemente permite una rápida permeación de moléculas a través de la membrana, dejando solamente proteínas en la matriz mitocondrial, las cuales generan el hinchamiento observado como resultado de la presión oncótica. Otra posibilidad es que el  $^{86}Rb^+$  sí provoque el hinchamiento

mitocondrial, pero durante el experimento en el proceso de filtración haya un intercambio con  $\text{Rb}^+$  no radioactivo, utilizado como medio de lavado, resultando en una salida del  $^{86}\text{Rb}^+$  a través del poro abierto.

En presencia de 0.4 mM Pi se pierde parcialmente el potencial transmembranal al agregar  $\text{K}^+$ , sugiriendo que el YMUC es selectivo y regulado por la concentración de Pi. En esas condiciones, tanto el hinchamiento como la captación de  $\text{Rb}^+$  correlacionan. Al aumentar la concentración de Pi hasta 4mM, no se observó hinchamiento mitocondrial, mientras que la captación de  $^{86}\text{Rb}^+$  fue ligeramente menor que a 0.4 mM. Con 4mM Pi el YMUC está cerrado por lo tanto la captación de  $\text{K}^+$  se lleva a cabo por un sistema diferente, el cual es mucho menos activo. Esto sugiere que a 4mM Pi donde no se observa hinchamiento, probablemente se deba a la activación del antiportador  $\text{K}^+/\text{H}^+$  (Jung y cols., 1997).

Por lo tanto, en la levadura la vía de reciclamiento de  $\text{K}^+$  es muy semejante al que ocurre en la mitocondria de mamíferos, pues ambas mantienen niveles similares de  $\text{K}^+$ , que a su vez son menores a las que se encuentran en el citosol (Brierley y cols., 1994; Garlid, 1996). En mitocondrias de mamífero el  $\text{K}^+$  ingresa a la matriz a través de un mecanismo que se abre cuando disminuyen los niveles de ATP y es activado por el potencial transmembranal (Beavis y col., 1993). Ya en la matriz, el  $\text{K}^+$  es liberado al citoplasma a través del antiportador  $\text{K}^+/\text{H}^+$  (Brierley y col., 1984, 1994). En la levadura el antiportador  $\text{K}^+/\text{H}^+$  ya se ha descrito (Jung y cols., 1997; Villalobo y cols., 1981), mientras que el sistema de entrada que se describe en este trabajo funciona como un equivalente al descrito para las mitocondrias de mamíferos. Corroborando esta idea, en las condiciones donde el YMUC está cerrado, se observó aumento en la sensibilidad a  $\text{Mg}^{++}$  y Quinina, inhibidores de la captación de  $\text{K}^+$  en los mamíferos (Fig. 10).

En nuestras condiciones experimentales, la velocidad de captación de  $^{86}\text{Rb}^{++}$  fue lenta, por lo tanto no fue posible alcanzar un equilibrio antes de que el potencial transmembranal se colapsara, aún en presencia de peróxido de hidrógeno. Por lo tanto, la adición del inhibidor del antiportador, el  $\text{Zn}^{++}$  sugirió que la captación de  $^{86}\text{Rb}^{++}$  está balanceada por una salida activa del catión a

través del antiportador. Esto se demuestra al observar un aumento de la concentración de  $^{86}\text{Rb}^{++}$  en presencia de  $\text{Zn}^{++}$  (Fig. 11).

En este trabajo se observó un sistema de captación de  $^{86}\text{Rb}^+$  en condiciones donde el poro inespecífico o YMUC está cerrado. Ese sistema es usado por la mitocondria para transportar  $\text{K}^+$  al aumentar el potencial transmembranal. Sugerimos que, en condiciones de poro cerrado, el sistema de transporte de potasio de la mitocondria de levadura es muy parecido al sistema de transporte reportado en mamíferos. Es decir, un uniportador dependiente de energía se encarga de la captación y un antiportador saca al  $\text{K}^+$ . Ambos sistemas son sensibles a los mismos inhibidores específicos.

## VII. CONCLUSIONES.

- Las mitocondrias de levadura poseen un uniportador para captar el potasio, y un antiportador ( $K^+/H^+$ ) para sacar al catión.
- La sensibilidad a diferentes inhibidores de estos transportadores es similar a la reportada en otros sistemas. La quinina y el  $Mg^{++}$  inhiben al uniportador; el  $Zn^{++}$  inhibe al antiportador
- Estos sistemas de transporte están enmascarados en condiciones de poro abierto, y pueden observarse cuando el poro está cerrado.

## VIII. PERSPECTIVAS.

- Se han identificado dos transportadores mitocondriales a los que se debe caracterizar para comprender mejor la fisiología mitocondrial.
- Debe estudiarse la interacción del poro de transición y los otros sistemas de transporte para comprender la función del primero.



## IX. BIBLIOGRAFÍA

**Äkerman KE**, and Wikström MK. (1976) Safranin as a probe of the mitochondrial membrane potential. *FEBS Lett.* 68(2), 191 - 197.

**Alberts B**, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, and Walter P (2002) *Molecular Biology of the Cell*. Introduction of the Cell. Genetic Information in Eucaryotes. Fourth Edition. New York.

**Anholt RR**, Pedersen PL, De Souza EB, and Snyder SH. (1986) The peripheral-type benzodiazepine receptor. Localization to the mitochondrial outer membrane. *J Biol Chem.* 261, 576 – 583.

**Ardehali H**, Chen Z, Ko Y, and Mejia-Alvarez R. (2004) Multiprotein complex containing succinate dehydrogenase confers mitochondrial ATP-sensitive K<sup>+</sup> channel activity. *Proc Natl Acad Sci USA.* 101, 11880 – 11885.

**Baines CP**, Kaiser RA, Purcell NH, Blair NS, Osinska H, Hambleton MA, Brunskill EW, Sayen MR, Gottlieb RA, and Dorn GWI. (2005) Loss of cyclophilin D reveals a critical role for mitochondrial permeability transition in cell death. *Nature.* 434, 658 – 662.

**Baines CP**, Kaiser RA, Sheiko T, Craigen WJ, and Molkentin JD. (2007) Voltage-dependent anion channels are dispensable for mitochondrial-dependent cell death. *Nature Cell Biology.* 9, 550 – 557.

**Ballarin C** and Sorgato MC (1995) An electrophysiological study of yeast mitochondria. Evidence for two inner membrane anion channels sensitive to ATP. *J Bio. Chem.* 270, 19262 – 19268.

**Basso E**, Fante L, Fowlkes J, Petronilli V, Forte MA, and Bernardi P. (2005) Properties of the permeability transition pore in mitochondria devoid of cyclophilin D. *J Biol Chem.* 280, 18558 – 18561.

**Beauvoit B**, Rigoulet M, Raffard G, Canioni P, and Guerin B. (1991) Differential sensitivity of the cellular compartments of *Saccharomyces cerevisiae* to

protonophoric uncoupler under fermentative and respiratory energy supply. *Biochemistry*. 30, 11212 – 11220.

**Beavis AD**, Brannan RD, and Garlid KD. (1985) Swelling and contraction of the mitochondrial matrix. I. A structural interpretation of the relationship between light scattering and matrix volume. *J Biol Chem*. 260(25), 13424 - 13433.

**Beavis AD** and Garlid KD (1990) Evidence for the allosteric regulation of the mitochondrial  $K^+/H^+$  antiporter by matrix protons. *J Biol Chem*. 265, 3538 – 2545.

**Beavis AD**, Lu Y, and Garlid KD. (1993) On the regulation of  $K^+$  uniport in intact mitochondria by adenine nucleotides and nucleotide analogs. *J Biol Chem*. 268(2), 997 - 1004.

**Bernardi P**, Broekemeier KM, and Pfeiffer DR. (1994). Recent progress on regulation of the mitochondrial permeability transition pore; a cyclosporin-sensitive pore in the inner mitochondrial membrane. *J Bioenerg Biomembr*. 26, 509–517.

**Bernardi P**. (1999) Mitochondrial transport of cations: channels, exchangers and permeability transition. *Physiol Rev*. 79, 1127–1155.

**Bernardi P**, Petronilli V, Di Lisa F, and Forte M. (2001) A mitochondrial perspective on cell death. *Trends Biochem Sci*. 26, 112–117.

**Bernardi P**, Penzo D, and Wojtczak L. (2002) Mitochondrial energy dissipation by fatty acids. Mechanisms and implications for cell death. *Vitam Horm*. 65, 97 – 126.

**Bernardi P**, Krauskopf A, Basso E, Petronilli V, Blalchy-Dyson E, Di Lisa F, and Forte MA. (2006). The mitochondrial permeability transition from in vitro artifact to disease target. *FEBS J*. 273, 2077 – 2099.

**Berry EA**, Guergova-Kuras M, Huang LS, and Crofts AR (2000) Structure and function of cytochrome bc complexes. *Annu Rev Biochem*. 69, 1005-1075.

**Beutner G**, Rück A, Riede B, Welte W, and Brdiczka D. (1996) Complexes between kinases, mitochondrial porin and adenylate translocator in rat brain resemble the permeability transition pore. *FEBS Lett*. 396, 189 – 195.

**Boumans H**, Grivell LA, and Berden JA. (1998) The respiratory chain in yeast behaves as a single functional unit. *J Biol Chem.* 273, 4872 – 4877.

**Boyer PD.** (2002) Catalytic site occupancy during ATP synthase catalysis. *FEBS Lett.* 512, 29-32.

**Bränden G**, Gennis RB, and Brzezinski P. (2006) Transmembrane proton translocation by cytochrome *c* oxidase. *Biochim Biophys Acta.* 1757, 1052-1063.

**Bränden G**, Pawate AS, Gennis RB, and Brzezinski P. (2006) Controlled uncoupling and recoupling of proton pumping in cytochrome *c* oxidase. *Proc Natl Acad Sci.* 103, 317-322.

**Brandt U.** (1997) Proton-translocation by membrane-bound NADH:ubiquinone-oxidoreductase (complex I) through redox-gated ligand conduction. *Biochim Biophys Acta.* 1318, 79-91.

**Bribes E**, Carriere D, Goubet C, Galiegue S, Casellas P, and Lafontaine J (2004) Immunohistochemical assessment of the peripheral benzodiazepine receptor in human tissues. *J Histochem Cytochem.* 52, 19 – 28.

**Brierley GP**, Jurkowitz MS, Farooqui T and Jung DW. (1984) K<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiport in heart mitochondria. *J Biol Chem.* 259(23): 14672 - 14628.

**Brierley GP**, Baysal K and Jung DW. (1994) Cation transport systems in mitochondria: Na<sup>+</sup> and K<sup>+</sup> uniports and exchangers. *J Bioenerg Biomembr.* 26(5): 519 - 26.

**Brustovetsky N** and Klingenberg M. (1996) Mitochondrial ADP/ATP carrier can be reversibly converted into a large channel by Ca<sup>2+</sup>. *Biochemistry.* 35, 8483 – 8488.

**Carroll J**, Fearnely IM, Shannon RG, Hirst J, and Walker JE. (2003) Analysis of the subunit composition of complex I from bovine heart mitochondria. *Mol Cell Proteomics.* 2, 117-126.

**Castrejón V**, Parra C, Moreno R, Peña A, and Uribe S. (1997) Potassium collapses the  $\Delta P$  in yeast mitochondria while the rate of ATP synthesis is inhibited only partially: modulation by phosphate. *Arch Biochem Biophys.* 346, 37 – 44.

**Cesura AM**, Pinard E, Schubanel R, Goetschy V, Friedlein A, Langen H, Polcic P, Forte MA, Bernardi P, and Kemp JA (2003) The voltage-dependent anion channel is the target for a new class of inhibitors of the mitochondrial permeability transition pore. *J Biol Chem.* 278, 49812–49818.

**Chen C**, Ko Y, Delannoy M, Ludtke SJ, Chiu W, and Pedersen PL. (2004) Mitochondrial ATP syntasome: three-dimensional structure by electron microscopy of the ATP synthase in complex formation with carriers for Pi and ADP/ATP. *J Biol Chem.* 279, 31761 – 31768.

**Chomyn A**, Mariottini P, Cleeter MWJ, Ragan CI, Matsuno-Yagi A, Hatefi Y, Doolite RF, and Attardi G. (1985) Six unidentified Reading frames of human mitochondrial DNA encode components of the respiratory-chain NADH dehydrogenase. *Nature.* 314, 592 - 597.

**Cortés P**, Castrejón V, Sampedro JG, and Uribe S. (2000) Interactions of arsenate, sulphate and phosphate with yeast mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta.* 1456, 67 – 76.

**Cortés-Rojo C**, Calderón-Cortés E, Clemente-Guerrero M, Manzo-Avalos S, Uribe S, Boldogh I, Saavedra-Molina A. (2007) Electron transport chain of *Saccharomyces cerevisiae* mitochondria is inhibited by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> at succinate-cytochrome c oxidoreductase level without lipid peroxidation involvement. *Free Radic Res.* 41(11), 1212 – 1223.

**Costantini P**, Chernyak BV, Petronilli V, and Bernardi P (1996) Modulation of the mitochondrial permeability transition pore by pyridine nucleotides and dithiol oxidation at two separate sites. *J Biol Chem.* 271, 6746 – 6751.

**Crompton M** and Costi A. (1988) Kinetic evidence for a heart mitochondrial pore activated by Ca<sup>++</sup>, inorganic phosphate and oxidative stress. A potential

mechanism for mitochondrial dysfunction during cellular  $\text{Ca}^{++}$  overload. *Eur J Biochem.* 178, 489 – 501.

**Crompton M** and Costi A. (1990) A heart mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent pore of possible relevance to re-perfusion-induced injury. Evidence that ADP facilitates pore interconversion between the closed and open states. *Biochem J.* 266(1): 33 - 9.

**Crompton M**, Virji S, and Ward JM. (1998) Cyclophilin- D binds strongly to complexes of the voltage-dependent anion channel and the adenine nucleotide translocase to form the permeability transition pore. *Eur J Biochem.* 258, 729 – 735.

**Crompton M**, Barksby E, Johnson N, and Capano M. (2002) Mitochondrial intermembrane junctional complexes and their involvement in cell death. *Biochimie.* 84(2–3), 143 – 152.

**De Kloet S**, van Wermeskerken R, and Koningsberger VV. (1961) Studies on protein synthesis by protoplasts of *Saccharomyces carlsbergensis*. I. The effect of ribonuclease on protein synthesis. *Biochim Biophys Acta.* 47, 138 - 143.

**De Risi JL**, Iyer VR, and Brown PO (1997) Exploring the metabolic and genetic control of gene expression on a genomic scale. *Science.* 278(5338), 680 - 686.

**De Vries S** and Marres CAM. (1987) The mitochondrial respiratory chain of yeast. Structure and biosynthesis and the role in cellular metabolism. *Biochimica et Biophysica Acta.* 895, 205 - 239.

**Dejean L**, Beauvoit B, Guérin B and Rigoulet M. (2000) Growth of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* on a non-fermentable substrate: control of energetic yield by the amount of mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta.* 1457, 45 – 56.

**Devin A**, Guérin B, and Rigoulet M. (1997) Control of oxidative phosphorylation in rat liver mitochondria: effect of ionic media. *Biochim et Biophys Acta.* 1319, 293 – 300.

**Dieckmann CL**, Pape LK and Tzagoloff A. (1992) Identification and cloning of a yeast nuclear gene (CBP1) involved in expression of mitochondrial cytochrome b. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 79(6): 1805 - 1809.

**Diwan JJ.** (1986) Effect of quinine on mitochondrial K<sup>+</sup> and Mg<sup>++</sup> flux. *Biochem Biophys Res Commun.* 135(3), 830 – 836.

**Diwan JJ**, Haley T, and Sanadi DR. (1988) Reconstitution of transmembrane K<sup>+</sup> transport with a 53 kilodalton mitochondrial protein. *Biochem Biophys Res Commun.* 153, 224 – 230.

**Edwards G** and Weston AH. (1990) Structure-activity relationships of K<sup>+</sup> channel openers. *Trends Pharmacol Sci.* 11, 417 – 422.

**Esposti MD.** (1998) Inhibitors of NADH-ubiquinone reductase: an overview. *Biochem Biophys Acta.* 1364, 222 - 235.

**Eubel H**, Jänsch L, and Braun HP. (2003) New insights into the respiratory chain of plant mitochondria. Supercomplexes and a unique composition of complex II. *Plant Physiol.* 133, 274 – 286.

**Ferreira GC** and Pedersen PL. (1993) Phosphate transport in mitochondria: past accomplishments, present problems, and future challenges. *J Bioenerg Biomembr.* 25(5): 483 - 492.

**Fiore C**, Trézéguet V, Le Saux A, Roux P, Schwimmer C, Dianoux AC, Noel F, Lauquin GJ, Brandolin G, Vignais PV. (1998) The mitochondrial ADP/ATP carrier: structural, physiological and pathological aspects. *Biochimie.* 80(2), 137 - 150.

**Fontaine E**, Eriksson O, Ichas F, and Bernardi P (1998) Regulation of the permeability transition pore in skeletal muscle mitochondria. Modulation by electron flow through the respiratory chain complex I. *J Biol Chem.* 273, 12662–12668.

**Forquer I**, Covian R, Bowman MK, Trumpower BL, and Kramer DM. (2006) similar transition states mediate the Q-cycle and superoxide production by the cytochrome *bc<sub>1</sub>* complex. *J Biol Chem.* 281, 38459-38465.

**Forte M** and Bernardi P. (2005) Genetic Dissection of the Permeability Transition Pore. *J Bioenerg Biomembr.* 37, 121 – 128.

**Frey TG** and Mannella CA. (2001). The internal structure of mitochondria. *Trends Biochem Sci.* 25, 319 – 324.

**García JJ** and Capaldi RA. (1998) Unisite catalysis without rotation of the gamma-epsilon domain in *Escherichia coli* F<sub>1</sub>-ATPase. *J Biol Chem.* 273, 15940-15945.

**García JJ**, Morales-Ríos E, Cortés-Hernández P, and Rodríguez-Zavala J. (2006) The inhibitor protein (IF1) promotes dimerization of the mitochondrial F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATP synthase. *Biochemistry.* 45, 12695-12703.

**Garlid KD**, DiResta DJ, Beavis AD, and Martin WH. (1986) On the mechanism by which dicyclohexylcarbodiimide and quinine inhibit K<sup>+</sup> transport in rat liver mitochondria. *J Biol Chem.* 261, 1529 – 1535.

**Garlid KD.** (1996) Cation transport in mitochondria--the potassium cycle. *Biochim Biophys Acta.* 1275(1-2): 123 - 126.

**Garlid KD** and Paucek P (2003) Mitochondrial potassium transport : the K<sup>+</sup> cycle. *Biochim Biophys Acta.* 1606, 23-24.

**Geneviève A**, Vaillier J, Salin B, Schaeffer J, Giraud MF, Dautant A, Brèthes D, and Velours J. (2004) The modulation in subunits e and g amounts of yeast ATP syntase modifies mitochondrial cristae morphology. *J Biol Chem.* 279, 40392 – 40399.

**Goffeau A**, Barrell BG, Bussey H, Davis RW, Dujon B, Feldmann H, Galibert F, Hoheisel JD, Jacq C, Johnston M, Louis EJ, Mewes HW, Murakami Y, Philippsen P, Tettelin H, and Oliver SG. (1996) Life with 6000 genes. *Science.* 274(5287): 546, 563 – 567.

**Gornall AG**, Bardawill CJ, and David MM. (1949) Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. *J Biol Chem.* 177(2), 751 - 766.

**Grandier-Vazeille X**, Bathany K, Chagnepain s, Camougrand N, Manon S, and Schmitter JM. (2001) Yeast mitochondrial dehydrogenases are associated in a supramolecular complex. *Biochemistry*. 40, 9758 - 9769.

**Grivell LA**, Artal-Sanz, M, Hakkaart G, de Jong L, Nijtmans LGJ, van Oosterum K, Siep M, and van der Spek H. (1999) Mitochondrial assembly in yeast. *FEBS Letters*. 452, 57 – 60.

**Guérin B**, Bukusoglu C, Rakotomanana F, and Wohlrab H. (1990) Mitochondrial phosphate transport. N-ethylmaleimide insensitivity correlates with absence of beef heart-like Cys42 from the *Saccharomyces cerevisiae* phosphate transport protein. *J Biol Chem*. 265(32), 19736 - 19741.

**Guérin B**, Bunoust O, Rouqueys V, Rigoulet M. (1994) ATP-induced unspecific channel in yeast mitochondria. *J Biol Chem*. 269(41), 25406 - 25410.

**Gupte S**, Wu ES, Hoehli L, Hoehli M, Jacobson K, Sowers AE, Hackenbrock CR. (1984) Relationship between lateral diffusion, collision frequency, and electron transfer of mitochondrial inner membrane oxidation-reduction components. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 81(9), 2606 - 26010.

**Gutiérrez-Aguilar M**, Pérez-Vázquez V, Bunoust O, Manon S, Rigoulet M, Uribe S. (2007) In yeast, Ca<sup>2+</sup> and octylguanidine interact with porin (VDAC) preventing the mitochondrial permeability transition. *Biochim Biophys Acta*. 1767(10), 1245 - 1251.

**Hackenbrock CR**. (1966). Ultrastructural bases for metabolically linked mechanical activity in mitochondria. I. Reversible ultrastructural change in metabolic state in isolated liver mitochondria. *J Cell Biol*, 30, 269 – 297.

**Hackenbrock CR**, Chazotte B, Gupte SS. (1986) The random collision model and a critical assessment of diffusion and collision in mitochondrial electron transport. *J Bioenerg Biomembr*. 18(5), 331 - 368.

**Hagerhall C** (1997) Succinate:quinone oxidoreductases. Variations on a conserved theme. *Biochim Biophys Acta*. 1320, 107 – 141.



**Halestrap AP** and Davidson AM. (1990) Inhibition of Ca<sup>2+</sup>-induced large-amplitude swelling of liver and heart mitochondria by cyclosporin is probably caused by the inhibitor binding to mitochondrial-matrix peptidyl-prolyl cis-trans isomerase and preventing it interacting with the adenine nucleotide translocase. *Biochem J.* 268, 153 – 160.

**Halestrap AP**, Connern CP, Griffiths EJ, and Kerr PM. (1997a) Cyclosporin A binding to mitochondrial cyclophilin inhibits the permeability transition pore and protects hearts from ischaemia/reperfusion injury. *Mol Cell Biochem.* 174(1–2), 167 – 172.

**Halestrap AP** and Brenner C (2003). The adenine nucleotide translocase: a central component of the mitochondrial permeability transition pore and key player in cell death. *Curr Med Chem.* 10, 1507 – 1525.

**Hatefi Y.** (1985) The mitochondrial electron transport and oxidative phosphorylation system. *Annu Rev Biochem.* 54, 1015 - 69.

**Huang LS**, Borders TM, Shen JT, Wang CJ, and Berry EA (2005) Crystallization of mitochondrial respiratory complex II from chicken heart: a membrane–protein complex diffracting to 2.0 Å. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* 61, 380 – 387.

**Huang L**, Cobessia D, Tung EY, and Berry EA. (2005) Binding of the respiratory chain inhibitor antimycin to the mitochondrial bc<sub>1</sub> complex: A new crystal structure reveals an altered intramolecular hydrogen-bonding pattern. *J Mol Biol.* 351(3), 573 – 597.

**Huo X**, Su D, Wang A, Zhai Y, Xu J, Li X, Bartlam M, Sun F, and Rao Z. (2007) Preliminary molecular characterization and crystallization of mitochondrial respiratory complex II from porcine heart. *FEBS Journal.* 274, 1524 – 1529.

**Ichas F**, Jouaville LS, and Mazat JP. (1997) Mitochondria are excitable organelles capable of generating and conveying electrical and calcium signals. *Cell.* 89(7), 1145 – 1153.

**Jung DW**, Bradshaw PC, Pfeiffer DR. (1997) Properties of a cyclosporine-insensitive permeability transition pore in yeast mitochondria. *J Biol Chem.* 272, 21104 – 21112.

**Jung DW**, Chávez E, Brierley GP. (1977) Energy-dependent exchange of K<sup>+</sup> in heart mitochondria. K<sup>+</sup> influx. *Arch Biochem Biophys.* 183(2), 452 - 459.

**Kaplan RS** (2001) Structure and function of mitochondrial anion transport proteins. *J Membr Biol.* 179(3), 165 - 183.

**Kennedy EP** and Lehninger AL. (1949) Oxidation of fatty acids and tricarboxylic acid cycle intermediates by isolated rat liver mitochondria. *J Biol Chem.* 179(2), 957 - 972.

**Kinnally KW**, Zorov DB, Antonenko YN, Snyder SH, McEnery MW, and Tedeschi H (1993) Mitochondrial benzodiazepine receptor linked to inner membrane ion channels by nanomolar actions of ligands. *Proc Natl Acad Sci USA.* 90, 1374 – 1378.

**Klingenberg M** (1989) Molecular aspects of the adenine nucleotide carrier from mitochondria. *Arch Biochem Biophys.* 270 (1), 1 – 14.

**Ko YH**, Delannoy M, Hüllihen J, Chiu W, and Pedersen PL (2003) Mitochondrial ATP synthasome. Cristae-enriched membranes and a multiwell detergent screening assay yield dispersed single complexes containing the ATP synthase and carriers for Pi and ADP/ATP. *J Biol Chem.* 278,12305 – 12309.

**Kokoszka JE**, Waymire KG, Levy SE, Sligh JE, Cai J, Jones DP, MacGregor GR, and Wallace DC (2004) The ADP/ATP translocator is not essential for the mitochondrial permeability transition pore. *Nature.* 427, 461 – 465.

**Kopustinskiene DM**, Toleikis A, and Saris NE. (2003) Adenine nucleotide translocase mediates the K(ATP)-channel-openers-induced proton and potassium flux to the mitochondrial matrix. *J Bioenerg Biomembr.* 35, 141 – 148.

**Krämer R** and Palmieri F. (1989) Molecular aspects of isolated and reconstituted carrier proteins from animal mitochondria. *Biochim Biophys Acta*. 974(1), 1 - 23.

**Krämer R** (1998) Mitochondrial carrier proteins can reversibly change their transport mode: the case of the aspartate/glutamate and the phosphate carrier. *Exp Physiol*. 83, 259 – 265.

**Krause F**, Scheckhuber CQ, Werner A, Rexroth S, Reifschneider NH, Dencher NA, and Osiewacz HD. (2004) Supramolecular organization of cytochrome c oxidase- and alternative oxidase-dependent respiratory chains in the filamentous fungus *Podospora anserina*. *J Biol Chem*. 279(25), 26453 - 26461.

**Lacza Z**, Snipes JA, Kis B, Szabo C, Grover G, and Busija DW. (2003) Investigation of the subunit composition and the pharmacology of the mitochondrial ATP-dependent K<sup>+</sup> channel in the brain. *Brain Res*. 994, 27 – 36.

**Lange C** and Hunte C. (2002) Crystal structure of the yeast cytochrome bc<sub>1</sub> complex with its bound substrate cytochrome c. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 99(5), 2800 - 2805.

**Lê-Quốc K**, and Lê-Quốc D. (1985) Crucial role of sulfhydryl groups in the mitochondrial inner membrane structure. *J Biol Chem*. 260, 7422 – 7428.

**Lenaz G**, Fato R, Genova ML, Bergamini Ch, Bianchi C, and Biondi A. (2006) Mitochondrial complex I: structural and functional aspects. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1757, 1406 - 1420.

**Leung ACW** and Halestrap AP. (2008) The mitochondrial phosphate carrier interacts with cyclophilin-D and the adenine nucleotide translocase and may play a key role in the permeability transition. *J Biol Chem*. On Publishing.

**Leung AWC** and Halestrap AP. (2008) Recent progress in elucidating the molecular mechanism of the mitochondrial permeability transition pore. *Biochim Biophys Acta*. 1777(7-8), 946 - 952.

**Mannella CA**, Pfeiffer DR, Bradsaw PC, Moraru I, Slepchenko B, Loew LM, Hsieh C, Buttle K, and Marko M. (2001) Topology of the mitochondrial inner membrane: dynamics and bioenergetic implications. *IUBMB Life*. 52, 93–100.

**Mannella CA** (2006). The relevance of mitochondrial membrane topology to mitochondrial function. *Biochem Biophys Acta*. 1762, 140 – 147.

**Mannella CA** (2006) Structure and dynamics of the mitochondrial inner membrane cristae. *Biochim Biophys Acta*. 1763, 542 – 548.

**Manon S** and Guérin M. (1992) K<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchange in yeast mitochondria: sensitivity to inhibitors, solubilization and reconstitution of the activity in proteoliposomes. *Biochim Biophys Acta*. 1108(2), 169 - 176.

**Manon S** and Guérin M (1995) Investigation of the effects of Zn<sup>2+</sup> and Cu<sup>2+</sup> on the K<sup>+</sup> transport in yeast mitochondria. Evidences for the involvement of a Zn<sup>(2+)</sup>-binding protein in the K<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchange. *Biochem Mol Biol Int*. 35(3): 585 - 593.

**Manon S** and Guérin M (1997) The ATP-induced K<sup>(+)</sup>-transport pathway of yeast mitochondria may function as an uncoupling pathway. *Biochim Biophys Acta*. 1318(3): 317 - 321.

**Manon S** and Guérin M (1998) Investigation of the yeast mitochondrial unselective channel in intact and permeabilized spheroplasts. *Biochem Mol Biol Int*. 44(3): 565 - 575.

**Manon S**, Roucou X, Guerin M, Rigoulet M, and Guerin M. (1998) Minireview: characterization of the yeast mitochondria unselective channel: a counterpart to the mammalian permeability transition pore? *J Bioenerg Biomembranes*. 30, 419 – 429.

**Marres CA**, de Vries S, and Grivell LA. (1991) Isolation and inactivation of the nuclear gene encoding the rotenone-insensitive internal NADH: ubiquinone oxidoreductase of mitochondria from *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur J Biochem*. 195, 857 - 862.

**Martin WH**, Beavis AD, and Garlid KD. (1984) Identification of an 82,000-dalton protein responsible for K<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiport in rat liver mitochondria. *J Biol Chem.* 259, 2062 – 2065.

**Martin WH**, DiResta DJ, and Garlid KD (1986) Kinetics of inhibition and binding of dicyclohexylcarbodiimide to the 82,000-dalton mitochondrial K<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter. *J Biol Chem.* 261, 12300 – 12305.

**Martinou JC** and Green DR. (2001) Breaking the mitochondrial barrier. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 2(1), 63 – 67.

**McEnergy MW**, Snowman AM, Trifiletti RR, and Snyder SH (1992) Isolation of the mitochondrial benzodiazepine receptor: association with the voltage-dependent anion channel and the adenine nucleotide carrier. *Proc Natl Acad Sci USA.* 89, 3170 – 3174.

**McGuinness O**, Yafei N, Costi A, and Crompton M. (1990) The presence of two classes of high-affinity cyclosporin A binding sites in mitochondria. Evidence that the minor component is involved in the opening of an inner-membrane Ca<sup>2+</sup>-dependent pore. *Eur J Biochem.* 194, 671 – 679.

**McStay GP**, Clarke SJ, and Halestrap AP. (2002) Role of critical thiol groups on the matrix surface of the adenine nucleotide translocase in the mechanism of the mitochondrial permeability transition pore. *Biochem J.* 367, 541 – 548.

**Mewes HW**, Alberman K, Bahr M, Frishmann D, Gleissner A, Hani J, Heumann K, Kleine K, Maieri A, Oliver SG, Pfeifer F, and Zollner A. (1997) Overview of the yeast genome. *Nature.* 387, 7 - 9.

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

**Mitchell P** and Moyle J. (1969) Translocation of some anions cations and acids in rat liver mitochondria. *Eur J Biochem.* 9, 149-155.

**Mitchell P.** (1976) Keilin's respiratory chain concept and its chemiosmotic consequences. *Science.* 206, 1148 – 1159.

**Nakashima RA** and Garlid KD. (1982) Quinine inhibition of Na<sup>+</sup> and K<sup>+</sup> transport provides evidence for two cation/H<sup>+</sup> exchangers in rat liver mitochondria. *J Biol Chem.* 257, 9252 – 9254.

**Nakashima RA**, Dordick RS, and Garlid KD. (1982) On the relative roles of Ca<sup>++</sup> and Mg<sup>++</sup> in regulating the endogenous K<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger of rat liver mitochondria. *J Biol Chem.* 257, 12540 – 12545.

**Nicholls DG** and Ferguson S J (1992) en Bioenergetics 2 (Academic Press Inc., Eds) pp. 3 - 20. Academic Press Limited, San Diego, USA.

**Nicholls DG** and Budd SL. (2000) Mitochondria and neuronal survival. *Physiol. Rev.* 80(1), 315 – 360.

**Nichols JW.** (1987) Binding of fluorescent-labeled phosphatidylcholine to rat liver nonspecific lipid transfer protein. *J Biol Chem.* 262(29), 14172 - 14177.

**Novgorodov SA**, Szulc ZM, Luberto C, Jones JA, Bielawski J, Bielawska A, Hannun YA, and Obeid LM. (2005) Positively charged ceramide is a potent inducer of mitochondrial permeabilization. *J Biol Chem.* 280(16), 16096 – 16105.

**Pacher P** and Hajnoczky G. (2001) Propagation of the apoptotic signal by mitochondrial waves. *EMBO J.* 20(15), 4107 – 4121.

**Palmieri F.** (2004) The mitochondrial transporter family (SLC25): physiological and pathological implications. *Pflugers Arch.* 447(5), 689 – 709.

**Papadopoulos V**, Amri H, Boujrad N, Cascio C, Culty M, Garnier M, Hardwick M, Li H, Vidic B, and Brown AS. (1997) Peripheral benzodiazepine receptor in cholesterol transport and steroidogenesis. *Steroids.* 62, 21 – 28.

**Pastorino JG**, Simbula G, Gilfor E, Hoek JB, and Farber JL (1994) Protoporphyrin IX, an endogenous ligand of the peripheral benzodiazepine receptor, potentiates induction of the mitochondrial permeability transition and the killing of cultured hepatocytes by rotenone. *J Biol Chem.* 269, 31041 – 31046.

**Paucek P**, Mironova G, Mahdi F, Beavis AD, Woldegiorgis G, and Garlid KD. (1992) Reconstitution and partial purification of the glibenclamide-sensitive, ATP-

dependent K<sup>+</sup> channel from rat liver and beef heart mitochondria. *J Biol Chem.* 267, 26062 – 26069.

**Paumard P**, Vaillier J, Coulary B, Schaeffer J, Soubannier V, Mueller DM, Brethes D, di Rago JP, and Velours J. (2002) The ATP synthase is involved in generating mitochondrial cristae morphology. *EMBO J.* 21, 221 – 230.

**Pavlov E**, Grigoriev SM, Dejean LM, Zweihorn CL, Mannella CA, and Kinnally KW. (2005) The mitochondrial channel VDAC has a cation-selective open state. *Biochim Biophys Acta.* 1710, 96 – 102.

**Pedersen PL.** (2007) Transport ATPases into the year 2008: a brief overview related to types, structures, functions and roles in health and disease. *J Bioenerg Biomembr.* 39, 349 – 355.

**Pedersen PL**, Ko YH, and Hong S. (2000) ATP Synthases in the year 2000: evolving views about the structures of these remarkable enzyme complexes. *J Bioenerg Biomembr.* 32(4), 325 - 332.

**Penzo D**, Petronilli V, Angelin A, Cusan C, Colonna R, Scorrano L, Pagano F, Prato M, Di Lisa F, and Bernardi P (2004) Arachidonic acid released by phospholipase A<sub>2</sub> activation triggers Ca<sup>2+</sup>-dependent apoptosis through the mitochondrial pathway. *J Biol Chem.* 279, 25219–25225.

**Peña A**, Piña MZ, Escamilla E, Piña E.(1977) A novel method for the rapid preparation of coupled yeast mitochondria. *FEBS Lett.* 80(1), 209 - 213.

**Pérez-Vázquez V**, Saavedra-Molina A, Uribe S. (2003) In *Saccharomyces cerevisiae*, cations control the fate of the energy derived from oxidative metabolism through the opening and closing of the yeast mitochondrial unselective channel. *J Bioenerg Biomembr.* 35(3): 231 - 241.

**Perkins G**, Renken C, Martone, ME, Young SJ, Ellisman M, and Frey T. (1997) Electron tomography of neuronal mitochondria: three-dimensional structure and organization of cristae and membrane contacts. *J Struct Biol.* 119, 260 – 272.

**Petronilli V**, Cola C, Massari S, Colonna R, and Bernardi P. (1993) Physiological effectors modify voltage sensing by the cyclosporin A-sensitive permeability transition pore of mitochondria. *J Biol Chem.* 268, 21939–21945.

**Petronilli V**, Penzo D, Scorrano L, Bernardi P, and Di Lisa F. (2001) The mitochondrial permeability transition, release of cytochrome c and cell death. Correlation with the duration of pore openings in situ. *J Biol Chem.* 276(15), 12030 – 12034.

**Pfeiffer DR**, Gudz TI, and Novgorodov SA, Erdahl WL. (1995) The peptide mastoparan is a potent facilitator of the mitochondrial permeability transition. *J Biol Chem.* 270(9), 4923–4932.

**Prieto S**, Bouillaud F, Ricquier D, and Rial E. (1992) Activation by ATP of a proton-conducting pathway in yeast mitochondria. *Eur J Biochem.* 208(2), 487 - 491.

**Prieto S**, Bouillaud F, and Rial E. (1995) The mechanism for the ATP-induced uncoupling of respiration in mitochondria of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem J.* 307(Pt3), 657 - 661.

**Prieto S**, Bouillaud I, and Rial E. (1996) The nature and regulation of the ATP-induced anion permeability in *Saccharomyces cerevisiae* mitochondria. *Arch. Biochem. Biophys.* 334, 43 – 49.

**Raha S** and Robinson B. (2000) Mitochondria, oxygen free radicals disease and ageing. *Trends Biochem Sci.* 25, 502-508.

**Rasmussen N** (1995) Mitochondria structure and the practice of cell biology in the 1950s. *J Hist Biol.* 28, 381 – 349.

**Rigoulet M**, Aguilaniu H, Avèret N, Bonoust O, Camougrand N, Grandier-Vazeille X, Larsson Ch, Pahlman IL, Manon S, and Gustafsson L. (2004) Organization and regulation of the cytosolic NADH metabolism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biochem.* 256/257, 73 – 81.



**Rottenberg H** and Marbach M. (1990) Regulation of  $\text{Ca}^{2+}$  transport in brain mitochondria. II. The mechanism of the adenine nucleotides enhancement of  $\text{Ca}^{2+}$  uptake and retention. *Biochim Biophys Acta*. 1016, 87 – 98.

**Roucou X**, Manon S, and Guerin M. (1995) ATP opens an electrophoretic potassium transport pathway in respiring yeast mitochondria. *FEBS Lett*. 364, 161 – 164.

**Roucou X**, Manon S, and Guerin M. (1997) Conditions allowing different states of ATP- and GDP-induced permeability in mitochondria from different strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim Biophys Acta*. 1324, 120-132.

**Schägger H** and Pfeiffer K. (2000) Supercomplexes in the respiratory chains of yeast and mammalian mitochondria. *EMBO J*. 19, 1777 – 1783.

**Schultz BE** and Chan SI. (2001) Structures and proton-pumping strategies of mitochondrial respiratory enzymes. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*. 30, 23-65.

**Shapleigh JP** and Gennis RB. (1992) Cloning, sequencing and deletion from the chromosome of the gene encoding subunit I of the aa3 type cytochrome c oxidase *Rhodobacter sphaeroides*. *Mol Microbiol*. 6, 635-642.

**Sidhu A** and Beattie DS. (1983) Kinetics of assembly of complex III into the yeast mitochondrial membrane. Evidence for a precursor to the iron-sulfur protein. *J Biol Chem*. 258, 10649-10656.

**Small WC** and McAlister-Henn L (1998) Identification of a cytosolically directed NADH dehydrogenase in mitochondria of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol*. 180, 4051 - 4055.

**Sun F**, Huo X, Zhai Y, Wang A, Xu J, Su D, Bartlam M, and Rao Z (2005) Crystal structure of mitochondrial respiratory membrane protein complex II. *Cell*. 121, 1043 – 1057.

**Szabo I** and Zoratti M. (1991) The giant channel of the inner mitochondrial membrane is inhibited by cyclosporin A. *J Biol Chem*. 266(6), 3376–3379.

**Szabo I** and Zoratti M (1993) The mitochondrial permeability transition pore may comprise VDAC molecules. I. Binary structure and voltage dependence of the pore. *FEBS Lett.* 330, 201 – 205.

**Szewczyk A**, Skalska J, Glab M, Kulawiak B, Malinska D, Koszela-Piotrowska I and Kunz S. (2006) Mitochondrial potassium channels: From pharmacology to function. *Biochim Biophys Acta.* 1757, 715 – 720.

**Trumpower BL.** (1990) Cytochrome  $bc_1$  complex of microorganisms. *Microbiological Reviews.* 54, 101-129.

**Tsukihara T**, Aoyama H, Yamashita E, Tomisaki T, Yamaguchi H, Shinzawa-Itoh K, Nakashima R, Yaono R, and Yoshicawa S. (1996) The whole structure of the 13-subunit oxidized cytochrome c oxidase at 2.8 Å. *Science.* 272, 1136-1144.

**Uribe S**, Sánchez N, and Peña A. (1991) Effects of  $K^+$  and other monovalent cations on yeast mitochondria. *Biochem. Int.* 24, 615 – 624.

**Van Lis R**, Atteia A, Mendoza-Hernandez G, and Gonzalez-Halphen D. (2003) Identification of novel mitochondrial protein components of *Chlamydomonas reinhardtii*. A proteomic approach. *Plant Physiol.* 132, 318 – 330.

**Velours J**, Rigoulet M, and Guerin B. (1977) Protection of yeast mitochondrial structure by phosphate and other proton donating anions. *FEBS Lett.* 81, 18 – 22.

**Villalobo A**, Briquet M and Goffeau A. (1981) Electrogenic proton ejection coupled to electron transport through the energy-conserving site 2 and  $K^+/H^+$  exchange in yeast mitochondria. *Biochim Biophys Acta.* 637(1): 124 - 129.

**Walter L**, Miyoshi H, Leverage X, Bernardi P, and Fontaine E. (2002) Regulation of the mitochondrial permeability transition pore by ubiquinone analogs. *Free Radic Res.* 36, 405 - 412.

**Westheimer FH.** (1987) Why nature chose phosphates. *Science.* 235(4793): 1173 - 1178.

**Wikström M.** (2004) Cytochrome c oxidase: 25 years of the elusive proton pump. *Biochim Biophys Acta.* 1655, 241-247.

**Wilkens S** and Capaldi RA. (1998) Electron microscopic evidence of two stalks linking the F<sub>1</sub> and F<sub>0</sub> parts of the *Escherichia coli* ATP synthase. *Biochim Biophys Acta.* 1365, 93-97.

**Wittig I**, Carrozzo R, Santorelli FM, and Schägger H. (2006) Supercomplex and subcomplexes of Mitochondrial Oxidative Phosphorylation. *Biochimica et Biophysica Acta.* 1757, 1066-1072.

**Wohlrab H.** (1986) Molecular aspects of inorganic phosphate transport in mitochondria. *Biochim Biophys Acta.* 853(2), 115 - 134.

**Wehrle JP** and Pedersen PL. (1989) Phosphate transport processes in eukaryotic cells. *J Membr Biol.* 111(3), 199 - 213.

**Xia H**, Su D, Wang A, Zhai Y, Xu J, Li X, Bartlam M, Sun F, and Rao Z. (2007) Preliminary molecular characterization and crystallization of mitochondrial respiratory complex II from porcine heart. *FEBS J.* 274, 1524 – 1529.

**Zoccarato F** and Nicholls D. (1982) The role of phosphate in the regulation of the independent calcium-efflux pathway of liver mitochondria. *Eur J Biochem.* 127(2): 333 - 338.

**Zoratti M** and Szabò I. (1995) The mitochondrial permeability transition. *Biochim Biophys Acta.* 1241(2), 139 - 176.

## ANEXO 1

# Closure of the Yeast Mitochondria Unspecific Channel (YMUC) Unmasks a $Mg^{2+}$ and Quinine Sensitive $K^+$ Uptake Pathway in *Saccharomyces cerevisiae*

Vicente Castrejón,<sup>1</sup> Antonio Peña,<sup>1</sup> and Salvador Uribe<sup>1,2</sup>

Received February 7, 2002; accepted May 12, 2002

The  $K^+$  uptake pathways in yeast mitochondria are still undefined. Nevertheless, the  $K^+$ -mediated mitochondrial swelling observed in the absence of phosphate ( $PO_4$ ) and in the presence of a respiratory substrate has led to propose that large  $K^+$  movements occur in yeast mitochondria. Thus, the uptake of  $K^+$  by isolated yeast mitochondria was evaluated. Two parallel experiments were conducted to evaluate  $K^+$  transport: those were mitochondrial swelling and the uptake of the radioactive  $K^+$  analog  $^{86}Rb^+$ . The opening of the yeast mitochondrial unspecific channel (YMUC) was regulated by different  $PO_4$  concentrations. The high protein concentrations used to measure  $^{86}Rb^+$  uptake resulted in a slight stabilization of the transmembrane potential at 0.4 nM  $PO_4$ , but not at 0.4  $\mu$ M  $PO_4$ . At 4 nM  $PO_4$ , swelling was inhibited while, in contrast,  $^{86}Rb^+$  uptake was still observed. The results suggest that an energy-dependent  $K^+$  uptake mechanism was unmasked when the YMUC was closed. To further analyze the properties of this  $K^+$  uptake system, the  $Mg^{2+}$  and quinine sensitivity of both swelling and  $^{86}Rb^+$  uptake were evaluated. Under the conditions where the unspecific pore was closed,  $K^+$  transport sensitivity to  $Mg^{2+}$  and quinine increased. In addition, when  $Zn^{2+}$  was added as an antigenic inhibitor, uptake of  $^{86}Rb^+$  increased. It is suggested that in yeast mitochondria, the  $K^+$  concentration is highly regulated by the equilibrium of uptake and exit of this cation through two specific transporters.

**KEY WORDS:** Permeability transition,  $K^+$  transport,  $K^+$  channels, yeast mitochondria, YMUC

## INTRODUCTION

In the cell,  $K^+$  is the most abundant cation, both in the cytoplasm and within the mitochondrial matrix, where its concentration has been estimated at 140 mM (for a review, see Brierley *et al.*, 1994).  $K^+$  is perhaps the main mitochondrial osmoregulator, and the volume of the matrix is modified in response to the  $K^+$  movements across the mitochondrial inner membrane. In mammalian mitochondria, the uptake of  $K^+$  was first proposed to occur through a 53 kDa uniporter (Ewan *et al.*, 1988). More recently, a mitochondrial  $K_{ATP}$  channel was identified which is similar to the plasma membrane uptake system (Iscou *et al.*, 1991); the  $K^+$  uniport activity seems to have little

dependence on pH although it exhibits high sensitivity to adenine nucleotides (Bravis *et al.*, 1993). The mitochondrial and the plasma membrane  $K_{ATP}$  channels are both closed by ATP or glibenclamide (Garfil, 1996) and probably by ruthenium red (Kapur *et al.*, 1990). The exit of  $K^+$  is catalyzed through an antiport with protons, as predicted by Mitchell (1961) and characterized by Brierley (1978). These two  $K^+$  transport systems control the concentration of  $K^+$  within isolated mitochondria (Garfil, 1990). In turn, mitochondrial  $K^+$  has large effects on mitochondrial volume, thus regulating diverse processes, such as oxidative phosphorylation and fatty acid catabolism (Haloung, 1990; Nicholls *et al.*, 1972). The release of  $K^+$  is activated when mitochondrial  $Mg^{2+}$  or nucleotides are depleted, or when the pH is increased (Jurek *et al.*, 1990). It has been proposed that the recycling of  $K^+$  needs to be highly regulated in order to avoid the depletion of both the transmembrane potential and the pH gradient (Garfil, 1990).

<sup>1</sup> Biochemistry Department, Instituto de Fisiología Celular, UNAM, Apdo Postal 70242, 06719 México City, México

<sup>2</sup> To whom correspondence should be addressed; e-mail: suri@iicfci.azh.unam.mx

Mitochondria are regarded as perfect osmometers (Chappel and Crofts, 1966; Rosconi *et al.*, 1995). The swelling method has been used to study many mitochondrial transport systems including the  $K^+H^+$  uniporter (Barvin *et al.*, 1993; Brierley *et al.*, 1994). Using this method, several features of the mammalian  $K^+H^+$  uniporter have been defined (Garlid, 1982): it is inhibited by  $Mg^{2+}$  (Jung and Brierley, 1986); by dicyclohexylcarbodiimide (DCCD) (Martin *et al.*, 1986) and by quinone (Brierley and Jung, 1982; Nakashima and Garlid, 1982). In addition, it has been demonstrated that quinone exhibits a partial inhibitory effect on the  $K^+$  uniporter (Dwan, 1986).

The mitochondrial swelling method also allowed the characterization of the  $K^+H^+$  uniporter in mitochondria from *Saccharomyces cerevisiae*, which is similar to the uniporter from mammalian mitochondria, except that in yeast inhibition by  $Mg^{2+}$  is not detected and transport is active at physiologic pH (Rosconi *et al.*, 1995; Wolfstahl *et al.*, 1993). In addition it was demonstrated that the yeast  $K^+$  uniporter is sensitive to  $Zn^{2+}$  or  $Cu^{2+}$  (Mason and Galvin 1992, 1995).

The use of electrophysiological techniques has revealed the existence of high-conductance, unspecific ionic channels in the inner membrane of yeast mitochondria (Ballarín and Saguas, 1995, 1996). These unspecific channels have been characterized physiologically and have been tentatively identified as the equivalent to the permeability transition pore (PTP) from mammalian mitochondria (Zoratti and Szabo, 1995). Both the PTP and the yeast mitochondrial unspecific channel (YMUC) (Mason *et al.*, 1998) allow the passage of solutes with a MW of 1 to 1.5 kDa (Jung *et al.*, 1997; Zoratti and Szabo, 1995). However, while the PTP is opened by  $PO_4$  and  $Ca^{2+}$  and closed by cyclosporine (Bernardi *et al.*, 1984; Bernardi and Petrosilli, 1996), the YMUC is closed by  $PO_4$  and is not affected by  $Ca^{2+}$  or cyclosporine (Jung *et al.*, 1997). In yeast mitochondria, ATP induces the opening of the YMUC and thus, the collapse of the  $\Delta\psi$  when  $K^+$  is present and  $PO_4$  is absent, suggesting that yeast mitochondria accumulate  $K^+$  when the YMUC is open (Mason and Galvin, 1998).

It was decided to evaluate the correlation between osmotic swelling and  $^{86}Rb^+$  uptake in order to better define the  $K^+$  uptake mechanisms in yeast mitochondria. As described in the literature (Mason *et al.*, 1998), addition of different concentrations of  $PO_4$  resulted in the closure of the YMUC. In contrast, protein concentrations in the range used in our experiments exhibited only mild effects on the permeability status of mitochondria. Under the conditions where the YMUC remained closed, a  $K^+$  uptake system was unmasked, which probably is the equivalent to the

mammalian  $K^+$  uniporter and which is  $Mg^{2+}$  and quinone-sensitive. The uptake of  $^{86}Rb^+$  detected under these conditions did not lead to modification in the light scattering properties of the mitochondrial suspension.

## MATERIALS AND METHODS

### Materials

All chemicals were of the best quality commercially available. Mannitol, MES, KCl, HCl,  $MgCl_2$ , Quinone, Murexyl and FCCP, were from Sigma Chemicals (St. Louis, MO).  $^{86}RbCl$  was acquired from NEN Life Science Products, Inc. (Boston, MA). The yeast *Saccharomyces cerevisiae* was a commercial baker's strain (La Azteca, S.A.).

### Isolation of Yeast Mitochondria

Yeast cells were incubated in a rich liquid medium (De Krom *et al.*, 1981) under aeration (3 L/min) for 2 h and starved overnight in distilled water under aeration. After incubation, cells were harvested and suspended in cold, isotonic, isolation medium containing 0.5 M mannitol, 0.1% bovine serum albumin, 5 mM MES, pH 6.8 (TEA). The suspension was mixed with an equal volume of glass beads (0.45 mm diameter) and disrupted in a Braun cell homogenizer (Melsungen, Germany) and mitochondria were isolated from the homogenate by differential centrifugation as described before (Peña *et al.*, 1977). The concentration of mitochondrial protein was determined by bioassay (Gernal *et al.*, 1999). In the experiments reported here, 2  $\mu$ L/2mL of 10% oxygen peroxide were added in order to ensure the availability of oxygen throughout the experiment.

### Mitochondrial Swelling

The variations in mitochondrial volume were followed by measuring the decrease in optical density at a wavelength of 540 nm in an Aminco DW2000 spectrophotometer in split mode. The spectrophotometer was equipped with a magnetic stirrer.

### Transmembrane Potential

Sabtanine O was used to measure the transmembrane potential following the change in absorbance at 311–333 nm in an DW2000 Aminco spectrophotometer in dual mode (Akerman and Wikström, 1976).

<sup>86</sup>Rb<sup>+</sup> Transport

The uptake of rubidium was measured after preincubating mitochondria for 1 min in 0.6 M mannitol, 5 mM MES, pH 6.8 (TEA) plus the indicated concentrations of PO<sub>4</sub>, pH 6.8 (TEA), MgCl<sub>2</sub>, quinone and ZnCl<sub>2</sub>. Then, <sup>86</sup>RbCl was added to the final concentration indicated in each figure. After a second minute of incubation, 20 mM ethanol was added and 100 μL aliquots were taken at the indicated times. These samples were transferred to a nitrocellulose filter (0.45 mm pore) previously humidified and mounted on a high-vacuum Millipore multifilter. The filters were then washed using a buffer containing 0.6 M mannitol, 5 mM MES, 80 mM KCl, pH 6.8 (TEA) and transferred to scintillation vials, then 5 mL of scintillation liquid were added and radioactivity was measured in a Beckman LS5000 scintillation counter using the phosphate window.

## RESULTS

Mitochondrial Permeability Regulation by Inorganic Phosphate (PO<sub>4</sub>)

In the absence of inorganic phosphate, yeast mitochondria swell in the presence of K<sup>+</sup> (Velosus *et al.*, 1977). Under the conditions employed in this study, swelling was reevaluated, as a high concentration of mitochondria (3 mg/mL) was used in all experiments; in agreement with the literature, in the absence of PO<sub>4</sub> and in the presence of 20 mM KCl (Results not shown) or RbCl (Fig. 1) optical density decreased, indicating mitochondrial swelling because of ion fluxes through an open nonspecific pore (Castejon *et al.*, 1997; Mason *et al.*, 1998). This effect was energy-dependent, as indicated by the lack of swelling in the presence of the uncoupling agent FCCP (Fig. 1).

In order to further evaluate a possible effect of protein concentration on the opening state of the YMUC, the transmembrane potential was measured in the presence of different PO<sub>4</sub> concentrations and increasing protein (Fig. 2). In the absence of PO<sub>4</sub>, the transmembrane potential was depleted within 1 min at all the mitochondrial concentrations tested, although an initial increase in the potential was observed which was higher as protein increased from 0.5 to 3 mg protein/mL (Fig. 2A). When the same experiment was performed at 0.4 mM PO<sub>4</sub>, increasing protein resulted in a partial stabilization of the transmembrane potential. From 0.5 to 2.0 mg protein/mL, the potential still decreased to minimal values after 40 s, while at 3.0 mg protein/mL, depletion of the potential was

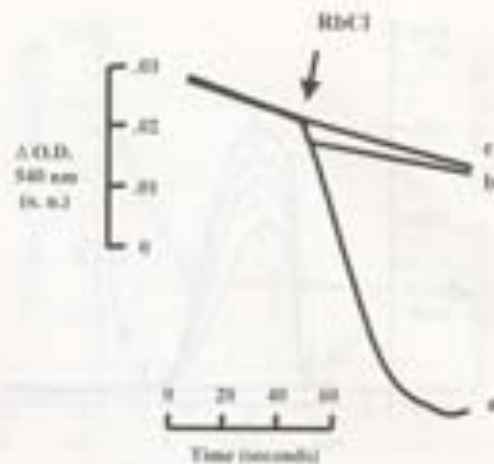


Fig. 1. Rubidium-mediated swelling of yeast mitochondria. Reaction mixture: 0.6 M mannitol, 0.7 mM MES, pH 6.8 (TEA), 20 mM ethanol, 2 μL 20% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (10%), mitochondria, 3 mg protein/mL. Where indicated concentrations used were: (a) 20 mM RbCl, (b) 20 mM RbCl plus 4 μM FCCP and (c) 0 RbCl. The arrow indicates rubidium addition. Swelling was determined spectrophotometrically at 540 nm, using an Aminco DW2000 spectrophotometer in split mode. Final volume was 2 mL. Experiment was carried out at room temperature.

only partial (Fig. 2B). Transmembrane potential depletion was not due to lack of oxygen, because oxygen peroxide was added in all experiments in sufficient quantity to last throughout the experiment. This was evaluated by oxygenometry using a Clark electrode (Results not shown). At 4 mM PO<sub>4</sub>, the transmembrane potential was stable at all the protein concentrations tested (Results not shown).

When increasing concentrations of PO<sub>4</sub> were added to the reaction mixture, the extent of mitochondrial swelling in response to the addition of 20 mM RbCl (Fig. 3) or KCl (Results not shown) decreased proportionally; swelling was almost completely inhibited at 1.0 mM PO<sub>4</sub>. In this regard, different groups have reported that at 0.4 mM PO<sub>4</sub>, the YMUC remains open most of the time, while at 4 mM PO<sub>4</sub>, the YMUC is closed (Mason and Gatten, 1997).

To further characterize the effect of PO<sub>4</sub> on K<sup>+</sup> uptake by yeast mitochondria, the uptake of <sup>86</sup>Rb<sup>+</sup> was evaluated in the absence of PO<sub>4</sub>, in the presence of 0.4 mM PO<sub>4</sub>, which is known to allow for K<sup>+</sup> mediated swelling, and at 4 mM PO<sub>4</sub>, where no swelling is observed. At 0.4 mM PO<sub>4</sub>, the YMUC is mostly opened, while at 4 mM PO<sub>4</sub>, the YMUC seems to be closed (Jung *et al.*, 1997; Velosus *et al.*, 1977). In the absence of PO<sub>4</sub>, no uptake of <sup>86</sup>Rb<sup>+</sup> could be detected (Fig. 4, trace a). In contrast, in the presence of 0.4 mM PO<sub>4</sub>, mitochondria accumulated

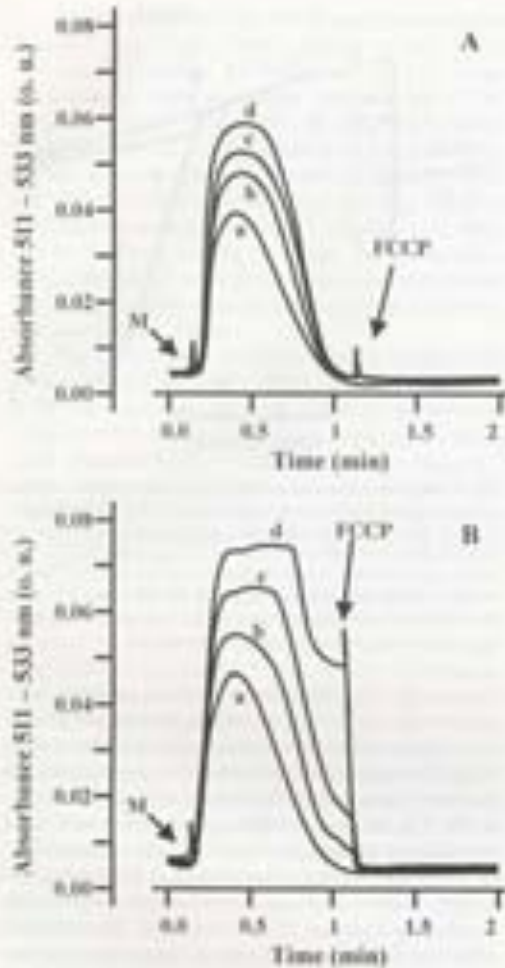


Fig. 3. Effect of  $PO_3$  concentration on the mitochondrial membrane potential. Experimental conditions were as in Fig. 1, except for 30  $\mu$ M valinomycin and different concentrations of mitochondrial protein as follows: (a) 0.7 mg/ml, (b) 1 mg/ml, (c) 2 mg/ml, (d) 3 mg/ml. Final volume was 2 mL. Mitochondria (M) or 9  $\mu$ M FCCP were added where indicated. (A) 0 and (B) 0.4 mM  $PO_3$ .  $PO_3$  was added from either a 0.1 M or a 1 M stock solution, pH 6.8 (TEA). Data are the means of six determinations  $\pm$  standard deviation.

approximately 10 nmoles of  $^{86}Rb^+$  (mg protein) $^{-1}$  in 2 min (Fig. 4, trace b). At 4 mM  $PO_3$ , the initial rate of uptake was similar to that observed at 0.4 mM  $PO_3$ ; however, at 4 mM  $PO_3$ ,  $^{86}Rb^+$  uptake slowed down after 30 s such that at 30 s, 5 nmoles  $^{86}Rb^+$  (mg protein) $^{-1}$  were accumulated by mitochondria and only a small increase in uptake was observed after 2 min of incubation (Fig. 4, trace

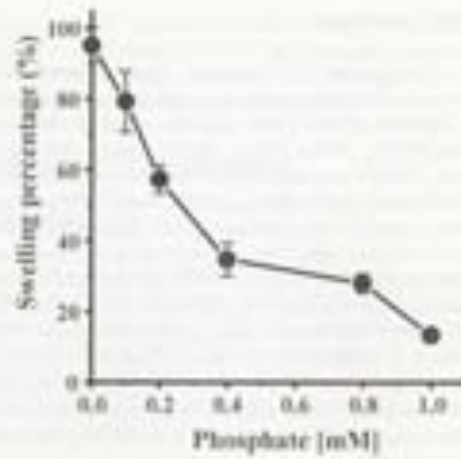


Fig. 3. Effect of  $PO_3$  on the  $K^+$ -mediated swelling of yeast mitochondria. Experimental conditions were as in Fig. 1, except that FCCP was 30  $\mu$ M and  $PO_3$  concentrations were as indicated.  $PO_3$  was added from either a 0.1 M solution or a 1 M stock solution, pH 6.8 (TEA). Data are expressed as percentages of the swelling in the absence of  $PO_3$ . Data are the means of four determinations  $\pm$  standard deviation.

(c). In all cases, the addition of FCCP inhibited the uptake of  $^{86}Rb^+$  (Results not shown). Taken together, the results indicate that  $PO_3$  inhibits the  $K^+$ -mediated swelling of mitochondria, while in contrast it promotes the uptake of the

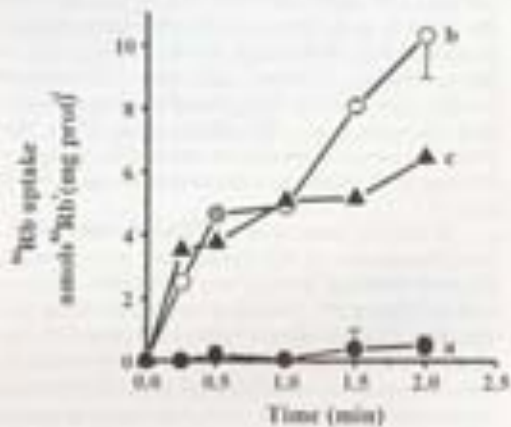


Fig. 4. Effect of  $PO_3$  on the uptake of  $^{86}Rb^+$  by yeast mitochondria. Experimental conditions were as in Fig. 1, except for the addition of 20 mM  $^{86}RbCl_2$  (2  $\mu$ L, 100  $\mu$ Ci (100%)). Final volume was 1 mL.  $PO_3$  concentrations were (a) 0, (b) 0.4 mM, and (c) 4 mM.  $PO_3$  was added from either a 0.1 M solution or a 1 M stock solution, pH 6.8 (TEA). Data are the means of six determinations  $\pm$  standard deviation.



radioactive K<sup>+</sup> analog <sup>86</sup>Rb<sup>+</sup> (i.e. there was no correlation between both parameters. In addition, the <sup>86</sup>Rb<sup>+</sup> uptake experiments indicated that there is an energy-dependent system for K<sup>+</sup> uptake, which may be studied in the presence of the PO<sub>4</sub> concentrations known to close the VMUC.

#### Regulation of Mitochondrial Permeability by Mg<sup>2+</sup> and Quinine

In mammalian mitochondria, Mg<sup>2+</sup> and quinine have been reported to inhibit the uptake of K<sup>+</sup>. In an effort to further characterize the K<sup>+</sup> uptake system in yeast mitochondria, the effects of Mg<sup>2+</sup> and quinine on the Rb<sup>+</sup>-mediated swelling of yeast mitochondria were tested in the presence of 0.4 mM PO<sub>4</sub>, where an active K<sup>+</sup> or Rb<sup>+</sup>-mediated swelling has been reported. It was observed that swelling was inhibited by increasing concentrations of Mg<sup>2+</sup>, reaching 50% inhibition at 1 mM Mg<sup>2+</sup> and stabilizing at a 70% inhibition at 2–4 mM Mg<sup>2+</sup> (Fig. 5A). When mitochondrial swelling was determined in the presence of increasing quinine concentrations, swelling decreased linearly with quinine concentrations, reaching 55% inhibition at 0.5 mM quinine (Fig. 5B).

In order to assess the correlation between the swelling experiments and monovalent cation uptake, the uptake of <sup>86</sup>Rb<sup>+</sup> was measured at 0.4 and 4 mM PO<sub>4</sub> and in the presence of increasing concentrations of Mg<sup>2+</sup> or quinine (Fig. 6). In the presence of increasing concentrations of Mg<sup>2+</sup>, the uptake of <sup>86</sup>Rb<sup>+</sup> decreased both in the presence of 0.4 mM PO<sub>4</sub> (Fig. 6(A), trace a) and 4 mM PO<sub>4</sub> (Fig. 6(A), trace b). The maximal inhibition was reached at both PO<sub>4</sub> concentrations at 2 mM Mg<sup>2+</sup>, although the Mg<sup>2+</sup>-mediated inhibition of uptake was higher at 4 mM PO<sub>4</sub>, reaching 1.62 nmoles <sup>86</sup>Rb<sup>+</sup> (mg protein)<sup>-1</sup>, than at 0.4 mM PO<sub>4</sub> where the uptake was 4.05 nmoles <sup>86</sup>Rb<sup>+</sup> (mg protein)<sup>-1</sup>. Quinine also inhibited the uptake of <sup>86</sup>Rb<sup>+</sup>, although, as expected from the swelling experiments, the effects were lower than with Mg<sup>2+</sup>. In addition, the quinine-mediated inhibition of <sup>86</sup>Rb<sup>+</sup> uptake was higher in the presence of 4 mM PO<sub>4</sub> (Fig. 6(B), trace b) than in the presence of 0.4 mM PO<sub>4</sub> (Fig. 6(B), trace a). The maximal inhibition of <sup>86</sup>Rb<sup>+</sup> uptake was reached in the presence of 0.5 mM quinine and 4 mM PO<sub>4</sub>, where uptake was 2.3 nmoles <sup>86</sup>Rb<sup>+</sup> (mg protein)<sup>-1</sup>. Thus, in the experiments using increasing concentrations of different Mg<sup>2+</sup> or quinine, the results obtained from the mitochondrial swelling and the <sup>86</sup>Rb<sup>+</sup> uptake experiments did correlate, indicating that both molecules inhibited the uptake of monovalent cations by yeast mitochondria. In this regard, the K<sup>+</sup> uptake systems from yeast mitochondria would be similar to its mammalian counterpart.

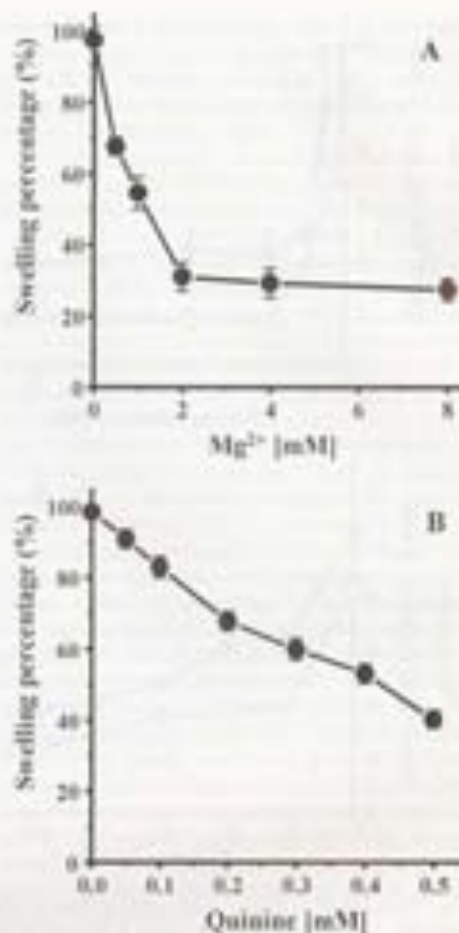


Fig. 5. Effect of Mg<sup>2+</sup> and Quinine on the Rb<sup>+</sup>-mediated swelling of yeast mitochondria. Reaction mixture used was the same as in Fig. 1, except that PO<sub>4</sub> concentration was 0.4 mM and either (A) different magnesium concentrations were added as indicated from a 100 mM MgCl<sub>2</sub> stock solution or (B) different quinine concentrations were added from a 50 mM stock solution in distilled formamide. Data are expressed as percentage of maximum swelling. Data are the means of five determinations ± standard deviation.

#### Effect of Zn<sup>2+</sup> on the Uptake of <sup>86</sup>Rb<sup>+</sup> by Yeast Mitochondria

The rate of <sup>86</sup>Rb<sup>+</sup> uptake by yeast mitochondria was far from the equilibrium predicted by the Nernst equation. This may be due to the slow rate of transport and/or to the establishment of an equilibrium where the

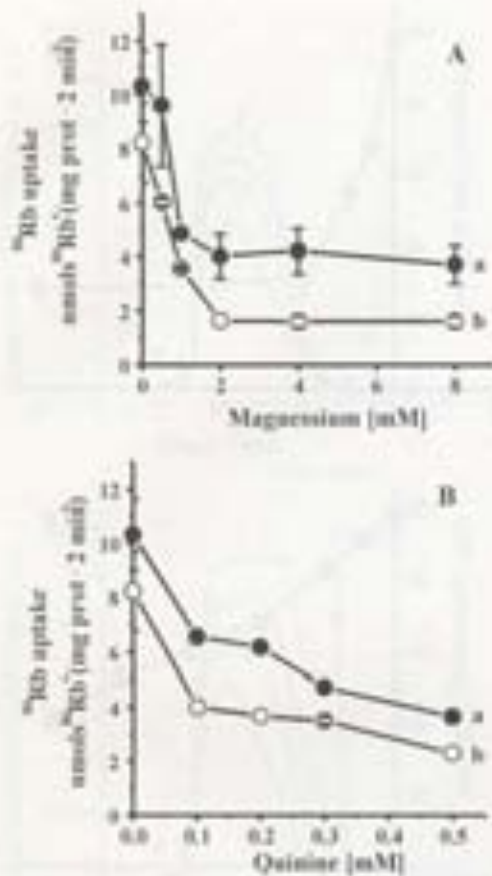


Fig. 6. Effect of  $\text{Mg}^{2+}$  or Quinine on the uptake of  $^{86}\text{Rb}^+$  by yeast mitochondria. Experimental conditions were as in Fig. 1 except that (A) different magnesium concentrations were added as indicated from a 1M  $\text{MgCl}_2$  stock solution and (B) different quinine concentrations were added from a 50 mM stock solution in dimethyl formamide (DMF), concentrations were (a) 0.0 mM or (b) 0.1 mM. Data are expressed as the uptake of  $^{86}\text{Rb}^+$  after 2 min. Data are the means of six determinations  $\pm$  standard deviation.

antiporter is actively expelling  $^{86}\text{Rb}^+$ . To explore this possibility, the uptake of  $^{86}\text{Rb}^+$  was measured in the presence of 0.5 mM  $\text{Zn}^{2+}$ , which inhibits the antiporter in yeast mitochondria (Mason and Guzmán, 1992, 1995) (Fig. 7). In the presence of 4 mM  $\text{PCl}_5$ , the addition of 0.5 mM  $\text{Zn}^{2+}$  resulted in an increase in the total amount of  $^{86}\text{Rb}^+$  uptake. Thus, the inhibition of the antiporter resulted in displacement of the equilibrium of  $^{86}\text{Rb}^+$  movements in mitochondria allowing for enhanced uptake and suggesting that this monovalent

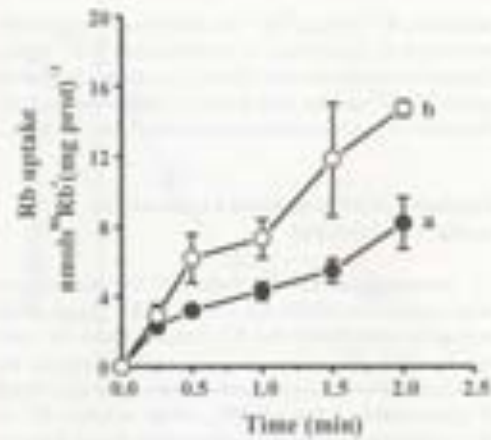


Fig. 7.  $^{86}\text{Rb}^+$  transport by yeast mitochondria—Effect of  $\text{Zn}^{2+}$ . Experimental conditions were as in Fig. 4. Except that  $\text{PCl}_5$  concentration was 4 mM.  $\text{ZnCl}_2$  was added from a 0.1 mM stock solution to a final concentration of (a) 0 or (b) 0.5 mM. Data are the means of six determinations  $\pm$  standard deviation.

cation uptake system is active under our experimental conditions.

#### DISCUSSION

Two different  $\text{K}^+$  uptake systems were detected in yeast mitochondria. These were the yeast mitochondrial nonspecific channel (YMUC) and a second pathway, which was detectable under conditions where the YMUC was closed. The second pathway is probably a uniporter for  $\text{K}^+$  and  $\text{Rb}^+$ , as the uptake of  $^{86}\text{Rb}^+$  was inhibited after 30 s under the conditions where the YMUC was closed and counter-ion movements were inhibited (Fig. 4, trace c). Another evidence favoring an electrogenic uniporter mechanism was the dependence of  $^{86}\text{Rb}^+$  transport on the  $\Delta\psi$ , i.e. when  $\Delta\psi$  was depleted in the presence of an uncoupler or because of the absence of  $\text{PCl}_5$ , no uptake of  $^{86}\text{Rb}^+$  was observed. The swelling data did not always correlate with the  $^{86}\text{Rb}^+$  uptake results, i.e. at 4 mM  $\text{PCl}_5$ , no swelling was detected while the uptake of  $^{86}\text{Rb}^+$  proceeded for the first 30 s and then reached a plateau. The lack of swelling probably results from the specificity of the  $^{86}\text{Rb}^+$  uptake system which does not allow for counter-ion movements and from its inhibition after 30 s, i.e. both the  $\text{PCl}_5$ -mediated lack of swelling and  $^{86}\text{Rb}^+$  uptake inhibition may be due to the impermeability of the membrane to chloride (once the YMUC is closed by 4 mM  $\text{PCl}_5$ ).

Both  $\text{Mg}^{2+}$  and quinine inhibited the uptake of monovalent cations in yeast mitochondria.  $\text{Mg}^{2+}$  was a better

inhibitor than quinone. The <sup>86</sup>Rb<sup>+</sup> uptake sensitivity to both Mg<sup>2+</sup> and quinone increased when the YMUC was closed, while it was enhanced by Zn<sup>2+</sup>, suggesting that the slow <sup>86</sup>Rb<sup>+</sup> uptake was probably counteracted by <sup>86</sup>Rb<sup>+</sup> efflux through the antiporter (Villalobo *et al.*, 1981). It was not possible to follow the uptake of <sup>86</sup>Rb<sup>+</sup> for longer than 2 min because of the possibility of O<sub>2</sub> depletion, even in the presence of added hydrogen peroxide. The highest <sup>86</sup>Rb<sup>+</sup> uptake was observed at the low PO<sub>2</sub> concentration (0.4 nM), where the YMUC seems to be mostly opened, but does not seem to be as unspecific as in the absence of added PO<sub>2</sub>. The Mg<sup>2+</sup> and quinone sensitivity suggests that the K<sup>+</sup> uptake system in yeast mitochondria is qualitatively similar to the mammalian uniporter (Barris *et al.*, 1993).

In mammalian mitochondria, PTP opening results in ΔΨ depletion and Ca<sup>2+</sup> efflux; it has been suggested that Ca<sup>2+</sup> detoxification may be a physiological function of the PTP in cells that are not programmed to die (Crompton and Costi, 1990). In yeast mitochondria, the opening of the YMUC also results in depletion of the ΔΨ and efflux of K<sup>+</sup> and probably other cations. These results suggest a general physiological role for unspecific mitochondrial pores, which may be involved in cation detoxification (Crompton and Costi, 1990). Furthermore, whether yeast undergo a process resembling apoptosis or not, is still controversial and ion detoxification would be a likely alternative as a putative function of mitochondrial unspecific channels (Mason *et al.*, 1996).

In the absence of PO<sub>2</sub>, where the YMUC is open and the transmembrane potential is depleted, K<sup>+</sup>-mediated swelling has been observed, (Castrojin *et al.*, 1997; Mason and Galvín, 1997). In the absence of PO<sub>2</sub>, no <sup>86</sup>Rb<sup>+</sup> accumulation was observed, even though swelling was present. Under these conditions, the YMUC was completely open, probably allowing for rapid permeation of molecules, leaving only proteins inside the matrix, and evoking swelling as a result of osmotic pressure. Another possibility, is that <sup>86</sup>Rb<sup>+</sup> was taken up leading to swelling, but the filtration process involving washing filters with cold Rb<sup>+</sup> resulted in the exit of <sup>86</sup>Rb<sup>+</sup> through the open YMUC.

In the presence of 0.4 nM PO<sub>2</sub>, the transmembrane potential was lost partially only if K<sup>+</sup> was added to the reaction mixture, suggesting that the unspecific pore became rather selective at this PO<sub>2</sub> concentration. Under this condition, both swelling and <sup>86</sup>Rb<sup>+</sup> uptake correlated. At 4 nM PO<sub>2</sub>, the data were still different, as no swelling was detected, while the uptake of <sup>86</sup>Rb<sup>+</sup> was only slightly less than at 0.4 nM PO<sub>2</sub>. At 4 nM PO<sub>2</sub>, the unspecific channel is closed and thus the uptake of K<sup>+</sup> seemed to be catalyzed by a different system, which was less active

than the YMUC. At 4 nM PO<sub>2</sub>, <sup>86</sup>Rb<sup>+</sup> did not promote swelling, probably due to the exit of K<sup>+</sup> through the reported K<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter (Chang *et al.*, 1997), which would be active in view of the high transmembrane potential detected at this PO<sub>2</sub> concentration.

Thus, in yeast, the K<sup>+</sup> recycling pathways seem to resemble mammalian mitochondria, in that they keep matrix K<sup>+</sup> at levels similar, or lower than those found in the cytosol (Barrisley *et al.*, 1994; Garlid, 1996). In mammalian mitochondria, K<sup>+</sup> enters the matrix through a uniporter that opens when ATP is depleted and is energized by the transmembrane potential (Barris *et al.*, 1993). Once in the matrix, K<sup>+</sup> is expelled to the cytoplasm throughout a K<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> uniporter (Barrisley *et al.*, 1994, 1996). In yeast, the K<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter has already been described (Chang *et al.*, 1997; Villalobo *et al.*, 1981), while the uptake system described here would serve an equivalent function to that of the mammalian uniporter. When the YMUC was closed, the uptake of <sup>86</sup>Rb<sup>+</sup> increased its sensitivity to the mammalian K<sup>+</sup> uptake inhibitors, Mg<sup>2+</sup> and quinone (Fig. 6).

Under our experimental conditions, the rate of <sup>86</sup>Rb<sup>+</sup> uptake was slow, and thus it was not possible to reach equilibrium before the transmembrane potential collapsed, once oxygen was depleted, even in the presence of oxygen peroxide. Nonetheless, addition of the antiporter inhibitor Zn<sup>2+</sup> (Mason and Galvín, 1992, 1995) led to higher uptake, suggesting that the uptake of <sup>86</sup>Rb<sup>+</sup> was counter balanced by an active exit of <sup>86</sup>Rb<sup>+</sup> through the uniporter.

A <sup>86</sup>Rb<sup>+</sup> uptake system was observed in yeast mitochondria under conditions where the unspecific pore is closed. This may be the system used by mitochondria to take up K<sup>+</sup> when in the presence of a high membrane potential. This transporter resembles the mammalian uniporter in its energy dependence as well as in the sensitivity to Mg<sup>2+</sup> and to quinone.

#### ACKNOWLEDGMENTS

This study was partially funded by the DGAPA/UNAM project IN-207600 and by CONACYT project 27568N. The technical assistance of Ramon Méndez and Norma Sánchez is acknowledged.

#### REFERENCES

- Mason, R. E. G., and Wikstrom, K. J. (1976). *J Biol Chem* **251**, 191-197.
- Bullatto, C., and Sgarbi, M. C. (1993). *J Biol Chem* **268**, 10262-10269.
- Bullatto, C., and Sgarbi, M. C. (1996). *J Bioenerg Biomembr* **28**, 125-130.
- Barris, S. E., Barrisley, R. D., and Garlid, R. D. (1993). *J Biol Chem* **268**, 13424-13431.

- Reyes, A. H., Liu, Y., and Garfál, K. D. (1995). *J Biol Chem* **270**, 1071-1076.
- Schmitt, P., Borkenstein, K. M., and Pfeiffer, H. K. (1994). *J Bioenerg Biomembr* **26**, 309-317.
- Schmitt, P., and Pfeiffer, H. K. (1996). *J Bioenerg Biomembr* **28**, 151-158.
- Shroy, G. P. (1994). In *The Molecular Biology of Mitochondria* (Shroy, G. P., Stoll, V., McLennan, H. H., and Tzagoff, A., eds.), Plenum, New York, pp. 395-408.
- Shroy, G. P., Beyerl, K., and Jung, D. W. (1994). *J Bioenerg Biomembr* **26**, 519-526.
- Shroy, G. P., and Jung, D. W. (1995). *J Bioenerg Biomembr* **27**, 191-208.
- Shroy, G. P., Ishikawa, M. S., Furumagi, T., and Jung, D. W. (1996). *J Biol Chem* **271**, 14672-14676.
- Tomino, Y., Fliets, C., Matsu, S., Peña, A., and Uribe, E. (1997). *Arch Biochem Biophys* **346**, 37-44.
- Chappel, J. R., and Castro, A. R. (1996). In *Regulation of Mitochondrial Protein Import* (Schroeder, W. E., Fagan, J. M., Papa, S., Quagliariello, E., and Stener, E. C., eds.), Elsevier, Amsterdam, pp. 201-212.
- Tompa, M., and Csuti, A. (1995). *Biochem J* **306**, 71-79.
- De Kleet, S. R., Van Wieringen, S. R. A., and Kung'u, V. V. (1992). *Biochem Biophys Res Commun* **187**, 134-143.
- Thoen, J. S. (1996). *Biochem Biophys Res Commun* **226**, 636-639.
- Thoen, J. J., Hahn, T., and Garfál, K. D. (1998). *Biochem Biophys Res Commun* **245**, 224-230.
- Garfál, K. D. (1990). *J Biol Chem* **265**, 11275-11279.
- Garfál, K. D. (1996). In *Regulation of Mitochondrial Protein Import* (Schroeder, W. E., Fagan, J. M., Papa, S., Quagliariello, E., and Stener, E. C., eds.), Plenum, New York, pp. 279-288.
- Garfál, K. D. (1996). *Biochem Biophys Res Commun* **225**, 123-126.
- David, G. S., Shuchter, J. C., and David, M. M. (1989). *J Biol Chem* **264**, 751-760.
- Waldberg, A. P. (1995). *Biochem Biophys Res Commun* **212**, 354-362.
- Scott, J., Nagata, H., Kishi, K., and Higazi, T. (1997). *Nature (London)* **385**, 264-267.
- Jack, F., Mihal, F., and Garfál, K. D. (1996). *J Biol Chem* **271**, 10722-10726.
- Jung, D. W., Borkenstein, K. M., and Pfeiffer, H. K. (1997). *J Biol Chem* **272**, 21106-21112.
- Jung, D. W., and Shroy, G. P. (1996). *J Biol Chem* **271**, 6438-6443.
- Kaplan, A., Sauer, K., Kuhl, K., Light, K., and Pappas, A. (1995). *J Biol Chem* **270**, 10363-10366.
- Mason, S., and Castro, M. (1992). *Biochem Biophys Res Commun* **189**, 169-176.
- Mason, S., and Castro, M. (1993). *Biochem Mol Biol Int* **28**, 545-561.
- Mason, S., and Castro, M. (1997). *Biochem Biophys Res Commun* **231**, 117-125.
- Mason, S., and Castro, M. (1998). *Biochem Mol Biol Int* **44**, 565-575.
- Mason, S., Wozniak, E., Castro, M., Ripstein, M., and Castro, H. (1996). *J Bioenerg Biomembr* **28**, 419-429.
- Mason, W. H., DeRosa, D. J., and Garfál, K. D. (1986). *J Biol Chem* **261**, 12286-12290.
- Mitchell, P. (1997). *Nature* **389**, 104-108.
- Nakamura, K. A., and Garfál, K. D. (1987). *J Biol Chem* **262**, 9272-9274.
- Nicholls, D. G., Gray, H. J., and Lindinger, D. (1972). *Eur J Biochem* **31**, 326-333.
- Peña, A., Peña, M. Z., Ferrando, E., and Pina, E. (1997). *FEBS Lett* **40**, 209-213.
- Romero, E., Mason, S., and Castro, M. (1997). *J Bioenerg Biomembr* **29**, 351-362.
- Vermeer, J., Ripstein, M., and Castro, H. (1977). *FEBS Lett* **61**, 16-22.
- Villalón, A., Ripstein, M., and Gallardo, A. (1981). *Biochem Biophys Res Commun* **101**, 124-129.
- Waldberg, A. A., Trifunovic, K. J., Garfál, K. D., and Wozniak, A. H. (1995). *Biochem Biophys Res Commun* **214**, 267-271.
- Zoratti, H., and Szallós, Z. (1995). *Biochem Biophys Res Commun* **210**, 139-178.

## ANEXO 2

## Potassium Collapses the $\Delta P$ in Yeast Mitochondria While the Rate of ATP Synthesis Is Inhibited Only Partially: Modulation by Phosphate<sup>1</sup>

Viviana Castrojón, Carmen Parra, Rafael Moreno,<sup>2</sup> Antonio Peña, and Salvador Uribe<sup>2</sup>

Department of Biochemistry, Instituto de Fisiología Celular, UNAM, Apdo Postal 70-242, 04510 México DF, México, and <sup>2</sup>Department of Biochemistry, Instituto Nacional de Cardiología, México DF, 14000

Received April 10, 1997, and in revised form June 24, 1997

Addition of increasing concentrations of  $K^+$  to yeast mitochondria in the presence of 0 to 400  $\mu M$  phosphate and 200  $\mu M$   $Mg^{2+}$  led to uncoupled respiration and decreased proton motive force ( $\Delta P$ ): at 0  $K^+$ ,  $\Delta P = 213$  mV, negative inside, where  $\Delta\psi = 190$  mV and  $\Delta pH = 23$  mV, while at 20  $mM$   $K^+$ ,  $\Delta P = 28$  mV, where  $\Delta\psi = 18$  mV and  $\Delta pH = 12$  mV. In contrast, the synthesis of ATP resulted in smaller values for the  $K_m$  and the  $V_{max}$  in 400  $\mu M$  Pi and increasing ADP: in 0  $K^+$ ,  $K_m = 18.6$   $\mu M$  and  $V_{max} = 75.4$   $\mu mol$  (min  $\cdot$  mg protein)<sup>-1</sup>, while in 20  $mM$   $K^+$ ,  $K_m = 3.2$   $\mu M$  and  $V_{max} = 45.0$   $\mu mol$  (min  $\cdot$  mg protein)<sup>-1</sup>, i.e., when  $K^+$  depleted most of the  $\Delta P$ , and at ADP concentrations below the  $K_m$ , the rate of ATP synthesis was essentially the same as in the absence of  $K^+$ . At saturating ADP, the rate of ATP synthesis in the presence of  $K^+$  was about 60% of the rate observed without  $K^+$ . The synthesis of ATP by yeast mitochondria was inhibited by oligomycin or uncouplers.  $K^+$  had no effects on rat liver mitochondria. Adenylate kinase activity was much smaller in yeast mitochondria than in rat liver mitochondria and thus did not account for the synthesis of ATP observed in the presence of  $K^+$ . The effects of  $K^+$  on the  $\Delta P$  of yeast mitochondria were prevented by increasing concentrations of phosphate (1 to 4  $mM$ ). At 4  $mM$  phosphate, the  $\Delta P$  was always above 200 mV and the kinetics of ATP synthesis were as follows: 0  $K^+$ ,  $K_m = 16.0$   $\mu M$  and  $V_{max} = 86.3$   $\mu mol$  (min  $\cdot$  mg protein)<sup>-1</sup>. At 20  $mM$   $K^+$ ,  $K_m = 7.4$   $\mu M$  and  $V_{max} = 123$   $\mu mol$  (min  $\cdot$  mg protein)<sup>-1</sup>. © 1997 Academic Press

**Key Words:** oxidative phosphorylation; localized proton pool; chemosmotic theory; yeast mitochondria; potassium; phosphate.

<sup>1</sup> Partially funded by CONACYT Grant 402443-2002PN.

<sup>2</sup> To whom correspondence should be addressed. Fax: (52) 522 3236. E-mail: uribe@fisiologia.fciqa.unam.mx.

The energy liberated by the mitochondrial respiratory chain is coupled to the phosphorylation of ATP by the  $F_1F_0$ ATPase. Protons pumped across the inner membrane are the coupling species which is dissipated by the synthesis of ATP (1, 2). The exact mechanism of transference of protons between the respiratory enzymes and the ATPase is still a matter of debate (3). Although the bulk  $\Delta pH$  does energize the synthesis of ATP, the possibility of other  $H^+$  transfer pathways between the respiratory enzymes and the ATPase has been proposed (3-9). Two possible mechanisms of non-bulk  $H^+$  transfer are that (i) protons travel in contact with the phospholipids of the membrane without equilibrating with the external medium (5-7) and (ii) proton transfer may occur through direct protein-protein interaction (8, 9).

Regarding proton travel through the phospholipid bilayer, two possibilities have been proposed. Either protons travel through the surface of the membrane, binding to the anionic phospholipids (5-7) or, alternatively, protons traverse the hydrophobic core through specific pathways. This last possibility has been explored in chloroplasts (10).

The direct transfer of protons may occur when a respiratory enzyme collides with the  $F_1F_0$ ATPase; the rate of diffusion of proteins in the inner membrane of mitochondria seems to be sufficient for this mechanism to occur (9). A second possibility would be the formation of stable protein-protein complexes; in this regard, the existence of a stable complex between cytochrome oxidase and the ATPase has been reported (8). In addition, evidence of direct interaction between NADH:Q oxidoreductase and ATPase has been obtained using uncoupler-inhibitor titrations (4).

In extreme alkaliphilic bacteria, the presence of alternative pathways for proton transfer has been proposed in view of the ability of these bacteria to synthe-

size ATP in the presence of an inverted bulk  $\Delta\mu\text{H}$  (11–13). In these bacteria, the formation of a cytochrome oxidase–ATPase complex may be favored by overexpression of cytochrome oxidase at high pH and by the presence of ionic affinity between these two proteins (13).

In addition to protons, mitochondria transport other ions with high affinity.  $\text{K}^+$  concentrations are very high in the cytoplasm. Mitochondria take up  $\text{K}^+$  by a uniport mechanism and expel it through an antiport with protons (14–17). In mammalian mitochondria,  $\text{K}^+$  transport is regulated by  $\text{Mg}^{2+}$  and by adenine nucleotides (14–17). It has been proposed that  $\text{K}^+$  transport needs to be highly regulated in order to maintain a high  $\Delta\mu\text{P}$  in mitochondria (14).

Yeast mitochondria exhibit higher conductance to  $\text{K}^+$  than mammalian mitochondria (18–20). Two uniporter mechanisms for the uptake of  $\text{K}^+$  have been described. The first one is activated by low pH or  $\text{Mg}^{2+}$  depletion, while the second is activated by high pH and by the addition of exogenous ATP. Mitochondrial swelling due to  $\text{K}^+$  addition is inhibited by high concentrations of phosphate (20).

The high  $\text{K}^+$  conductance exhibited by yeast mitochondria is probably due to the activity of two channels which have been detected in the internal membrane through the use of patch clamp techniques (21). The "large" channel has a conductance of 600 to 800 pS and the "small" channel has a conductance of 45 pS. These channels show a slight anionic selectivity with an open probability  $\text{Cl}^-/\text{K}^+$  of 4.2 and 3.3, respectively. ATP induces the opening of the large channel and the closing of the small channel (21).

The high  $\text{K}^+$  conductance of yeast mitochondria should result in depletion of  $\Delta\mu\text{P}$ . Therefore, inhibition of the processes that depend on  $\Delta\mu\text{P}$  should occur. A direct measurement of the effects of  $\text{K}^+$  on the components of the  $\Delta\mu\text{P}$  of yeast mitochondria would substantiate this proposition. In this regard, it has been reported that  $\text{Ca}^{2+}$  uptake by yeast mitochondria is reversed by the addition of  $\text{K}^+$  or  $\text{Na}^+$  (22).

Here, we report that in yeast mitochondria incubated in a medium containing low concentrations of phosphate and  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{K}^+$  addition resulted in a large decrease in the  $\Delta\mu\text{H}$  and  $\Delta\mu\text{P}$ . In contrast, the rate of ATP synthesis remained almost constant. Increasing concentrations of phosphate protected mitochondria from the effects of  $\text{K}^+$  addition. The results suggest that in yeast mitochondria there is an alternate mechanism by which protons are able to drive the synthesis of ATP.

#### MATERIALS AND METHODS

Chemicals were reagent grade, of the best quality commercially available. Mersalol, Mops, succinate, sulfonamide-O, and lyophilized bovine serum were from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO); carboxy-*Succinyl-CoA* and phosphoric acid were from Molecular Probes (Eu-

gene, OR); lyophilized glucose-6-phosphate dehydrogenase was from Boehringer Mannheim, Germany; Tetraphenyl (TPP) phosphonium bromide was from Amersham (Buckinghamshire, UK); a commercial strain of baker's yeast *Saccharomyces cerevisiae* ("La Azusa, S.A.") was purchased at the factory. The nonfluorescent succinyl bo-*Succinyl-CoA* (1799) was a gift from Dr. P. G. Heyler, Dupont de Nemours (Wilmington, DE).

**Isolation of yeast mitochondria.** Yeast was incubated in a rich liquid medium (22) under aeration (3 liters/min) for 5 h and stored overnight in distilled water under aeration. To isolate mitochondria, yeast were resuspended in isolation medium (0.8 M mannitol, 0.15 M sucrose, 0.05 M Mops, pH 6.8 adjusted with tris(hydroxymethyl)aminomethane) and disrupted as described previously using a Braun cell disruptor and 0.45-mm diameter glass beads (23). Mitochondria were isolated from the homogenate by differential centrifugation as described before (24). Mitochondrial protein was measured by the assay method (25).

**Isolation of rat liver mitochondria.** Rat liver mitochondria were prepared from male Wistar rats (200 g) from our local colony, following standard techniques and disruption as described previously (26). The isolation buffer was 220 mM mannitol, 70 mM sucrose, 2 mM Mops, and 1 mM EGTA. EGTA was omitted in the final two washes (27). Mitochondrial protein was determined by the assay method (25).

The rate of oxygen consumption was measured using a Clark electrode connected to an oscilloscope and a graph recorder. The reaction vessel was a water-jacketed closed chamber maintained at 20°C. Total volume was 3 ml (28, 29).

Sulfonamide-O was used to measure the transmembrane potential ( $\Delta\mu\text{P}$ ) following the absorbance changes at 315–345 nm in a DW 2000 spectrophotometer in the dual-wavelength mode as described by Akerman and Wikström (26). We used a final concentration of 0.5 mg protein of mitochondria. Yeast mitochondria were assayed in 0.8 M mannitol, 2 mM Mops, pH 6.8 (tris(hydroxymethyl)aminomethane), 20 mM ethanol, and 20  $\mu\text{M}$  sulfonamide-O. EGTA was added from a 1.0 M solution as cofactor, and phosphoric acid, pH 6.8, was added from a 1.0 M or 0.1 M stock solution as needed. The  $\Delta\mu\text{P}$  measurements in rat liver mitochondria were measured under the same conditions, except that the buffer was 220 mM mannitol, 70 mM sucrose, 2 mM Mops (pH 7.4), the substrate was 2 mM glutamate–oxaloacetate (pH 7.4), and phosphoric acid pH 7.4. The succinyl 1799 was added from a 0.5 mM solution in dimethylformamide to a final concentration of 0  $\mu\text{M}$ .

Tetraphenyl (TPP) distribution was also used to estimate the transmembrane potential ( $\Delta\mu\text{P}$ ) in yeast mitochondria. Yeast mitochondria (1 mg protein) were incubated at 20°C in 1 ml of 0.8 M mannitol, 2 mM Mops, pH 6.8 (TEA), 20 mM ethanol, and 0.4 mM TPP. Additions were 0.4 or 4 mM phosphoric acid (pH 6.8) and 0 or 20 mM EGTA, as indicated. After 3 min, samples were centrifuged rapidly at 10,000g for 1 min in a microfuge which was kept in a freezer (-20°C). Aliquots from the pellet and supernatant were measured in acetonitrile liquid and counted. Nonspecific binding was evaluated in disrupted mitochondria (2.5  $\mu\text{M}$  TPP plus 1  $\mu\text{g}$  succinate) and subtracted from the data. Alternatively, corrections were made for nonspecific binding to both external and internal faces of the mitochondrial membranes (26). The mitochondrial volume was assumed to be 0.7  $\mu\text{m}^3$  protein in the condensed state and 1  $\mu\text{m}^3$  in the swollen (high  $\text{K}^+$ , low P<sub>i</sub>) state (26). The results were used to calculate the  $\Delta\mu\text{P}$  by applying the Nernst equation.

**Loading of carboxyfluorescein.** The carboxyfluorescein ester of carboxyfluorescein (CFCEP-AM) was incorporated into the matrix by incubating yeast mitochondria (20 mg protein) in 1 ml of 0.8 M mannitol, 2 mM Mops, pH 6.8 (tris(hydroxymethyl)aminomethane), and 10  $\mu\text{l}$  of dimethyl sulfoxide containing 20  $\mu\text{g}$  CFCEP-AM and 0.1% phosphoric acid for 20 min at 20°C (31). After incubation, nonincorporated dye was washed by centrifuging mitochondria twice for 10 min at 12,000 rpm in a B1004 rotor in a Sorvall H-70E refrigerated centrifuge and eliminating the

experiment, mitochondria were resuspended in 0.5 ml and their protein concentration was measured (25).

The pH gradient ( $\Delta pH$ ) was determined in carbon-fluorescein-loaded yeast mitochondria by measuring fluorescence in a Farrand Mark II spectrofluorometer, using an excitation wavelength of 366 nm and an emission wavelength of 430 nm (21). At the end of each experiment, fluorescence was calibrated by adding 8  $\mu M$  1799 and 20  $\mu M$  valinomycin from a 10 mM stock solution in dimethylformamide and treating with 1  $\mu l$  aliquots of 2 M HCl to reach an acid pH and then 1  $\mu l$  aliquots of 2.5 N NaOH. Fluorescence was always measured simultaneously with the resulting pH using a glass electrode (Cole Parmer, IL) inserted in the system.

Calculation of the proton motive force ( $\Delta p$ ). The  $\Delta p$  and the  $\Delta pH$  values obtained experimentally were used to calculate the  $\Delta p$  under each condition tested (21, 22). The synthesis of ATP was determined after incubating mitochondria for 1 min. An enzyme-coupled assay system was used, containing 100.5  $\mu g/ml$  boackitase, 4  $\mu g/ml$  glucose-6-phosphate dehydrogenase, 20 mM glucose, and 100  $\mu M$  NADP<sup>+</sup>. The reduction of NADP<sup>+</sup> was followed spectrophotometrically using a wavelength of 340 nm (21). The rates of NADPH formation were calculated using an extinction coefficient of  $6.22 \times 10^4$  (m-cm)<sup>-1</sup>. Both boackitase and G6P dehydrogenase were suspended in 0.1 M citrate from the lyophilized powder. It was found that it is important not to use enzymes suspended in acetone/water buffer because this salt increased the  $\Delta p$  (results not shown).

Activity of adenylate kinase. This was measured as the oligonucleotidic AMP sensitive synthesis of ATP (26). Experiments were performed under the same conditions as for ATP synthesis with the exception that 25  $\mu g/ml$  protein oligonucleoside and different concentrations of AMP were used.

## RESULTS

**Effect of  $K^+$  on the respiratory rate of yeast mitochondria.** The rate of oxygen consumption in yeast mitochondria was measured in the presence of 0.4 and 4 mM phosphate with or without 20 mM KCl (Table I). At both phosphate concentrations tested, the addition of  $K^+$  resulted in an increase in the rates of oxygen uptake. In the presence of 0.4 mM phosphate,  $K^+$  addi-

TABLE I  
Effects of  $K^+$  and Phosphate on the Rate of Oxygen Consumption by Yeast Mitochondria

Assay system (mM)	State 3 (nmol O <sub>2</sub> min <sup>-1</sup> mg protein <sup>-1</sup> )	State 4 (nmol O <sub>2</sub> min <sup>-1</sup> mg protein <sup>-1</sup> )	Uncoupled (nmol O <sub>2</sub> min <sup>-1</sup> mg protein <sup>-1</sup> )	RC (20/24)
0.4 P, 0 K <sup>+</sup>	151 ± 0	84 ± 0	147 ± 10	1.5 ± 0.2
0.4 P, 20 K <sup>+</sup>	278 ± 36	270 ± 26	279 ± 26	1.0 ± 0
4.0 P, 0 K <sup>+</sup>	175 ± 14	126 ± 22	180 ± 26	1.4 ± 0.1
4.0 P, 20 K <sup>+</sup>	302 ± 25	173 ± 6	284 ± 12	1.2 ± 0.1

Note. Reaction mixture: 0.5 M sucrose, 5 mM Msc, pH 6.5, 0.2 mM MgCl<sub>2</sub>, 1  $\mu l$  valinomycin. The indicated concentrations of phosphate were added from a stock solution of 400 mM P<sub>i</sub>TES, pH 6.6.  $K^+$  was added from a 1 M KCl solution. Mitochondria were added at a final concentration of 0.5 mg protein/ml. After registering state 4 respiration for approximately 1 min, state 3 respiration was achieved by adding 100 mM ADP; after return to state 4 and further registration of the trace, mitochondria were uncoupled with 8  $\mu M$  1799. Temperature was 30°C and final volume was 2 ml. Data are means ± standard deviation of three different mitochondrial preparations.

TABLE II  
Effect of  $K^+$  and Phosphate on the Transmembrane Potential of Yeast Mitochondria: Determination of  $\Delta \psi$  with TPP<sup>+</sup>

Assay system (mM)	Method 1 (mV)	Method 2 (mV)
0 K <sup>+</sup> , 0.4 P <sub>i</sub>	142 ± 12	97 ± 10
20 K <sup>+</sup> , 0.4 P <sub>i</sub>	39 ± 10*	72 ± 7*
0 K <sup>+</sup> , 4.0 P <sub>i</sub>	161 ± 5	104 ± 1
20 K <sup>+</sup> , 4.0 P <sub>i</sub>	144 ± 16	82 ± 5
Uncoupled	0	67 ± 7

Note. Reaction mixture as in Fig. 1; phosphate and  $K^+$  concentrations are indicated. Samples containing a concentration of mitochondria of 1 mg (protein/milliliter) were incubated for 2 min at 30°C. Then, the samples were centrifuged in a refrigerated centrifuge for 1 min and an aliquot of the supernatant was taken. The pellet was dried and resuspended using 100  $\mu l$  of medium. Treatment of the data by method 1 or 2 is described under Materials and Methods. Uncoupled mitochondria were treated with 0.5  $\mu M$  1799 plus 20  $\mu M$  valinomycin. Data are means ± standard deviation,  $n = 8$ .

\*  $P < 0.001$  versus all other conditions in the same column except versus the uncoupled state ( $P < 0.001$ ).

tion resulted in depletion of the respiratory control (RC),<sup>2</sup> suggesting an uncoupling effect of  $K^+$  (Table I). This effect was prevented by a higher concentration of phosphate (4 mM) (Table I). Under optimal conditions, that is at 4 mM phosphate and 2 mM magnesium, the respiratory control increased up to 2.0 (results not shown). This value is similar to others reported in the literature (23).

**Effect of  $K^+$  on the transmembrane potential ( $\Delta \psi$ ) of yeast mitochondria.** Safranine-O was used to measure  $\Delta \psi$  continuously. In the presence of low concentrations of magnesium (200  $\mu M$ ) and phosphate (400  $\mu M$ ), the addition of increasing concentrations of  $K^+$  resulted in the collapse of  $\Delta \psi$  (Fig. 1A, Table II). Addition of 20 mM KCl completely collapsed  $\Delta \psi$  within 1 min. In the presence of EDTA, the decrease in  $\Delta \psi$  induced by  $K^+$  was faster (results not shown). In the presence of 4 mM phosphate,  $\Delta \psi$  was not sensitive to concentrations of up to 20 mM  $K^+$  (Fig. 1B, Table III). When the acetate salt of  $K^+$  was used instead of chloride, similar effects on  $\Delta \psi$  were observed (results not shown).

When added after  $K^+$ , increasing concentrations of phosphate resulted in the recovery of  $\Delta \psi$  (Fig. 2). From 0.4 to 1 mM phosphate,  $\Delta \psi$  was estimated to be under 30 mV. At 2 mM phosphate, the  $\Delta \psi$  was 60 mV, while at 4 and 8 mM phosphate the  $\Delta \psi$  reached levels similar to the control (180 mV). The recovery of  $\Delta \psi$  was not observed when acetate was added instead of phosphate (results not shown).

<sup>2</sup> Abbreviation used: RC, respiratory control.



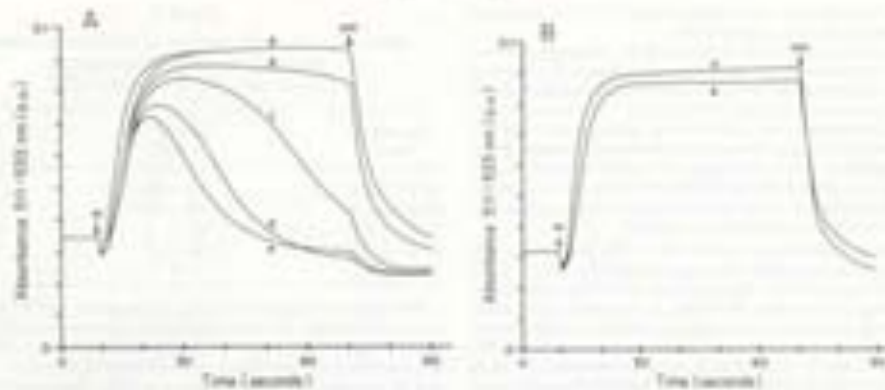


FIG. 1. Effect of increasing concentrations of  $K^+$  on the  $\Delta\psi$  of yeast mitochondria. (A) Modulation by phosphate. Experimental conditions: 0.5 M mannitol, 5 mM Msc, pH 6.8, 200  $\mu$ M  $MgCl_2$ , 20 mM sulfonol, 0.4 mM phosphate-TEA, pH 6.8, mitochondrial concentration, 0.5 mg protein/ml. Experiments were conducted at room temperature.  $KCl$  additions were (a) 0 or 1 mM, (b) 2 mM, (c) 5 mM, (d) 20 mM, and (e) 40 mM.  $KCl$  was added from a 1 M stock solution. (B) Same reaction conditions as in (A), except all samples contained 4 mM phosphate-TEA, pH 6.8.  $KCl$  concentrations were (a) 0 mM and (b) 20 mM.

To compare the effects of  $K^+$  on the  $\Delta\psi$  of yeast mitochondria with mitochondria from another source, similar experiments were conducted in rat liver mitochondria. In rat liver mitochondria,  $K^+$  has been reported to deplete the  $\Delta\psi$  only when in the presence of valinomycin (28). As expected, when we added up to 40 mM  $K^+$  to rat liver mitochondria, no effects on the  $\Delta\psi$  were observed, regardless of whether phosphate was present (results not shown).

Use of tetraphenyl [ $^3H$ ]phosphonium to measure  $\Delta\psi$  in yeast mitochondria. To corroborate the results obtained using safranine-O, the  $\Delta\psi$  was estimated by measuring the uptake of tritiated tetraphenyl phosphonium into yeast mitochondria (Table II). The data were

treated by either subtracting the uptake in the presence of an uncoupler and a respiratory chain inhibitor (method 1) or by a method described for rat liver mitochondria by Rottenberg (method 2) (29). The second method was used because of the large variations obtained at the potentials when the classical Nernst approach was used. Both methods showed that, in the presence of low phosphate,  $K^+$  addition decreased the  $\Delta\psi$  of yeast mitochondria to values which were significantly different from those observed in the absence of  $K^+$  or in the presence of high phosphate ( $P < 0.001$ ) but were not different from the value assigned to uncoupled mitochondria ( $P > 0.05$ ). The  $\Delta\psi$  values obtained by these methods were more variable than those observed

TABLE II  
Effects of  $K^+$  and Phosphate on the Transmembrane Electrical Gradient  
and on the Synthesis of ATP by Yeast Mitochondria

Ion concn (mM)	$\Delta\psi$ (mV)	$\Delta\psi_H$ (mV)	$\Delta\psi$ (mV)	ATP synthesis	
				$V_{max}$	$K_m$
0 $K^+$ , 0 $P_i$	-2	-23	-26	—	—
20 $K^+$ , 0 $P_i$	8	-9	-4	—	—
0 $K^+$ , 0.4 $P_i$	-190	-22	-212	75.4 $\pm$ 4.9	16.8 $\pm$ 2.3
20 $K^+$ , 0.4 $P_i$	-18	-12	-28	65.0 $\pm$ 2.2	5.2 $\pm$ 0.2
0 $K^+$ , 4.0 $P_i$	-180	-23	-202	88.2 $\pm$ 2.7	16.0 $\pm$ 0.8
20 $K^+$ , 4.0 $P_i$	-170	-21	-191	133.0 $\pm$ 6.7	7.4 $\pm$ 1.0

Note: The data were taken from experiments similar to those described in the legends to Figs. 1, 3, and 5. Mitochondria were incubated for 7 min after all the additions to ensure that the effects of  $K^+$  had been established.  $K_m$  values are  $\mu$ M,  $V_{max}$  values are nmol  $P_i$  min $^{-1}$  mg protein $^{-1}$ . Numbers indicated after the  $\pm$  sign are standard deviations from triplicate experiments.

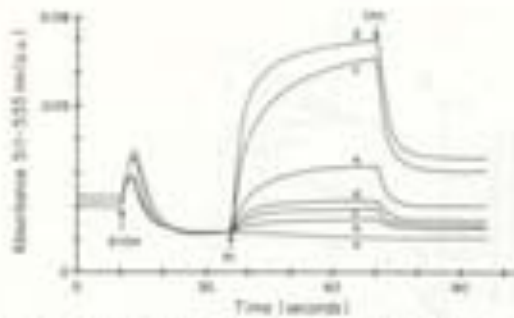


FIG. 2. Effect of the late addition of phosphate on the  $\Delta p$  of yeast mitochondria incubated in the presence of K<sup>+</sup>. Experimental conditions as in Fig. 1, except no phosphate was present at the beginning of the experiment and 20 mM KCl was added. Phosphate additions were made at 1 min as follows: (a) no addition, (b) 0.4 mM, (c) 0.8 mM, (d) 1 mM, (e) 2 mM, (f) 4 mM, and (g) 8 mM.

for safranine-O; however, the same tendency of K<sup>+</sup> to uncouple yeast mitochondria incubated in low phosphate was observed.

**Effect of K<sup>+</sup> on the  $\Delta pH$  of yeast mitochondria.** The effects of the addition of 20 mM K<sup>+</sup> on the  $\Delta pH$  of yeast mitochondria were determined in the presence of 0, 0.4, and 4 mM phosphate-Tris. Throughout the experiment, the external  $\Delta pH$  varied between 6.7 and 6.9. The external pH values obtained immediately before addition of 1799 and valinomycin are indicated in the figure (Fig. 3, Table III). The fluorescence on carboxyfluorescein varied with the different concentrations of phosphate used, and therefore, each trace was calibrated individually. Addition of K<sup>+</sup> resulted in a sharp increase in fluorescence in all cases. In 0 to 0.4 mM phosphate, the rise in internal pH was unstable and gradual acidification of the matrix took place near those seen before K<sup>+</sup> addition was observed (Fig. 3, upper and middle traces; Table III). In contrast, at higher phosphate concentrations (1 to 4 mM), the addition of K<sup>+</sup> resulted in a stable increase in matrix pH (Fig. 3, lower trace; Table III). When 1799 and valinomycin were added before K<sup>+</sup>, addition of the cation did not result in changes in the fluorescence-detected pH (results not shown).

As a control, both  $\Delta p$  and  $\Delta pH$  were measured in yeast mitochondria in the presence of the enzymes and substrates used to measure ATP synthesis. It was determined that the ammonium sulfate suspensions of enzymes could not be used because this salt inhibits the effects of K<sup>+</sup> on both the  $\Delta p$  and  $\Delta pH$  (results not shown). Once this was detected, we always used lyophilized enzymes suspended in citrate. Under these conditions, the reagents used to measure the synthesis of ATP (see Materials and Methods) did not modify the

effects of K<sup>+</sup> on either the  $\Delta p$  or the  $\Delta pH$  (results not shown).

**Calculation of the  $\Delta P$  of yeast mitochondria.** From the values obtained for  $\Delta p$  and  $\Delta pH$ , the value for  $\Delta P$  was calculated at different concentrations of phosphate (0, 0.4, and 4 mM) and 0 or 20 mM K<sup>+</sup> (Table III). In the absence of K<sup>+</sup> the  $\Delta P$  was always high. At high K<sup>+</sup> and in the presence of 0 or 0.4 mM phosphate the  $\Delta P$  decreased to very low values, while in the presence of 4 mM phosphate, the same addition of 20 mM K<sup>+</sup> did not have any effects on the  $\Delta P$ , i.e., at 4 mM phosphate K<sup>+</sup> addition did not modify the  $\Delta P$ .

**Effect of K<sup>+</sup> addition on the rate of ATP synthesis.** In yeast mitochondria, the kinetics of the synthesis of ATP at increasing concentrations of ADP were followed in the presence and absence of 20 mM K<sup>+</sup> and in the presence of either 0.4 mM (Fig. 4A) or 4 mM phosphate (Fig. 4B). K<sup>+</sup> did not inhibit the rate of synthesis of ATP, even at the lowest phosphate concentration, where results indicated that K<sup>+</sup> depleted the  $\Delta P$  (Table III). Replotting of the results from Fig. 4 as double-reciprocal indicated that there were only slight effects of K<sup>+</sup> on the kinetic values of the synthesis of ATP (Fig. 4, inserts). At 0.4 mM phosphate and in the absence of K<sup>+</sup>

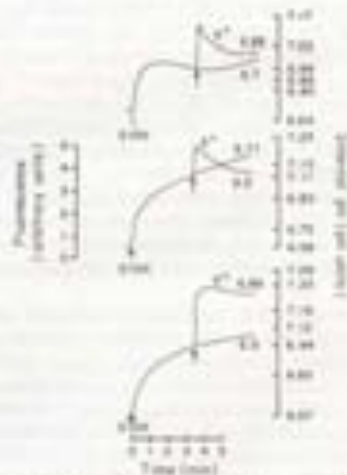


FIG. 3. Effect of K<sup>+</sup> on the internal pH of yeast mitochondria in the presence and absence of phosphate. Mitochondria were loaded with carboxyfluorescein as described under Materials and Methods. Reaction mixture as in Fig. 1, except phosphate concentrations were upper trace, 0 mM; middle trace, 0.4 mM; and lower trace, 4 mM. Where indicated, 20 mM KCl. At the end of each trace, safranine-O was calibrated in the presence of 0  $\mu$ M 1799 and 20  $\mu$ g/ml valinomycin adding aliquots of 1  $\mu$ l HCl and then 1  $\mu$ l NaOH while measuring simultaneously the fluorescence and the external pH with a pH electrode. Numbers after each trace indicate external pH before calibration.

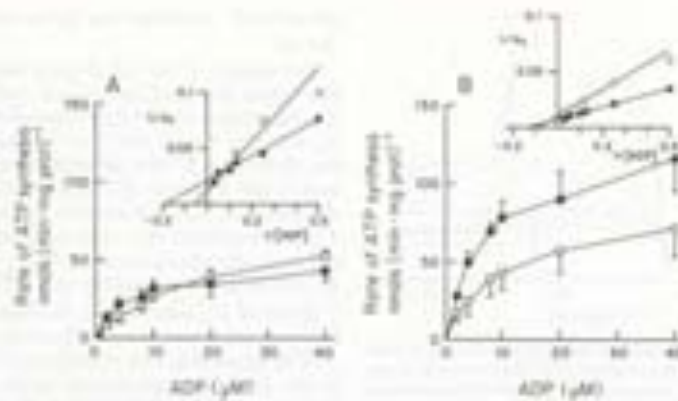


FIG. 4. Effect of  $K^+$  on the rate of synthesis of ATP. Reaction mixture as in Fig. 1, except KCl was 0 ( $\circ$ ) or 20 mM ( $\bullet$ ). The following reagents were added to measure the uncoupled synthesis of ATP: 20 mM glucose, 5 mM methyl isocitrate, 4  $\mu$ M glucose-6-phosphate dehydrogenase, 140  $\mu$ M NADP. The concentration of phosphate-TEA was (A) 0.4 mM or (B) 4 mM. Lines at each point are standard deviations. Insets are Lineweaver-Burk plots of the data.  $K_m$  and  $V_{max}$  were determined from the different traces using the origin program from IBM and are reported in the text.

the kinetic values were  $K_m = 18.6 \mu$ M and  $V_{max} = 75.4 \text{ nmol (min} \cdot \text{mg protein)}^{-1}$ , while in the presence of 0.4 mM Pi and 20 mM  $K^+$ ,  $K_m = 5.2 \mu$ M and  $V_{max} = 46.0 \text{ nmol (min} \cdot \text{mg protein)}^{-1}$  (Fig. 4A, insert; Table III). At 4 mM phosphate and 0  $K^+$ , the values were  $K_m = 59.0 \mu$ M and  $V_{max} = 58.3 \text{ nmol (min} \cdot \text{mg protein)}^{-1}$ , while at 4 mM Pi and 20 mM  $K^+$ ,  $K_m = 7.4 \mu$ M and  $V_{max} = 123 \text{ nmol (min} \cdot \text{mg protein)}^{-1}$  (Fig. 4B, insert; Table III). In short, at both 0.4 and 4 mM phosphate, the addition of  $K^+$  resulted in a lower  $K_m$ . The  $V_{max}$  was increased at 4 mM phosphate and diminished slightly at 0.4 mM phosphate. The addition of an uncoupler was tested at both 0.4 and 4 mM phosphate and this resulted in complete inhibition of the synthesis of ATP (results not shown).

Yeast mitochondria used here were tested under the optimal conditions for ATP synthesis reported by other groups; namely, 4 mM phosphate, 1 mM ADP, and 3 mM  $Mg^{2+}$ . Under these conditions, the synthesis of ATP was  $188 \pm 16.3 \text{ nmol (min} \cdot \text{mg protein)}^{-1}$  which is comparable to results by others (25). Furthermore, under these conditions, addition of 20 mM KCl resulted in an increase in the synthesis of ATP to  $246 \pm 5 \text{ nmol (min} \cdot \text{mg protein)}^{-1}$ .

**Adenylate kinase activity measurements.** In rat liver mitochondria, the addition of  $K^+$  did not have any effects on the rate on ATP synthesis, however, in the presence of oligomycin, a substantial residual activity was detected which was due to the presence of adenylate kinase. It was decided to evaluate the mitochondrial adenylate kinase activity in yeast, in order to determine whether the synthesis of ATP observed in

yeast mitochondria with a low  $\Delta\psi$  was due to the activity of adenylate kinase. The oligomycin-insensitive, AMP-sensitive rate of ATP synthesis in both rat liver and yeast mitochondria is shown in Fig. 5. The adenylate kinase activity of yeast mitochondria was at least one order of magnitude smaller than the rate of ATP synthesis observed in the absence of oligomycin. Furthermore, adenylate kinase activity in yeast mitochondria was much smaller than in rat liver mitochondria.

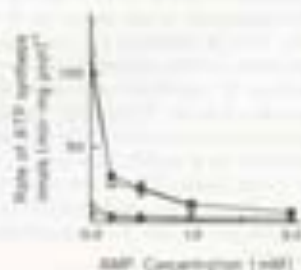


FIG. 5. Effect of AMP on the oligomycin-resistant synthesis of ATP by mitochondria from either yeast or rat liver. Experimental conditions: For yeast mitochondria, as in Fig. 1, except 25  $\mu$ M oligomycin. Rat liver mitochondria assays were performed in IBM test mixture, 70 mM sucrose, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 7.4 (TEA), plus 200  $\mu$ M MgCl<sub>2</sub>, 5 mM glutamate-malate, 400  $\mu$ M phosphate-Tris (pH 7.4), and 20  $\mu$ M oligomycin. Mitochondrial concentration was 0.5 mg protein/ml. AMP concentrations are indicated. ( $\circ$ ) Rat liver mitochondria, 0 mM KCl; ( $\bullet$ ) Rat liver mitochondria, 20 mM KCl; ( $\circ$ ) Yeast mitochondria, 0 mM KCl; ( $\bullet$ ) Yeast mitochondria, 20 mM KCl. Standard deviations are indicated unless they were smaller than the symbols.

although in either case, increasing concentrations of the competitive inhibitor AMP resulted in inhibition of the activity (Fig. 5).

#### DISCUSSION

In most energy-transducing membranes, the depletion of the bulk proton electrochemical gradient results in inhibition of the synthesis of ATP, as predicted by the chemosmotic theory (1, 2). Depletion of the proton motive force is generally achieved by adding uncouplers and/or decouplers (35, 36). Classical uncouplers deplete the bulk proton gradient, acting as transmembrane carriers of protons (1, 2). However, it has been proposed that the hydrophobic nature of the uncouplers results in interaction with the membrane, simultaneously depleting a putative localized pool of  $H^+$  (36). The decouplers have only minor effects on the bulk  $\Delta p$ , but still interfere with ATP production. Among the decouplers, there are some channel formers, such as gramicidin, and lipophilic molecules, such as fatty acids and anesthetics such as halothane (36). An interesting case are the modified molecules of gramicidin which cannot assemble to form a dimeric channel and still disrupt coupling (36, 37). The decoupling mechanism seems to involve either the drainage of an intramembrane  $H^+$  pool or the disruption of the protein complexes where direct proton transfer occurs (36). The effect on  $\Delta p$  and on the synthesis of ATP varies depending on which uncoupler or decoupler is used. These observations have led to propose the existence of a source of protons not located in the bulk phase which is used for the synthesis of ATP. To date, a condition where the bulk  $\Delta p$  is depleted selectively while maintaining the localized proton pool, and therefore the synthesis of ATP, has not been reported in mitochondria.

The high  $K^+$  conductance exhibited by yeast mitochondria (18–21) opened the possibility of collapsing the  $\Delta p$  without adding uncouplers. The permeability of yeast mitochondria to  $K^+$  is known to be inhibited by increasing concentrations of phosphate (19, 20) or magnesium (18). Therefore, these ions were used at low concentrations in our experiments. Under these conditions,  $K^+$  collapsed the  $\Delta p$ , as indicated by both the decrease in the respiratory control to 1.0 and the direct  $\Delta p$  measurements using safranine-O or tetraphenyl phosphonium. In contrast, the rate of ATP synthesis was nearly the same. These experiments were conducted without using uncouplers or decouplers, simply using the natural  $K^+$  transporters in the yeast organelle. In contrast to yeast mitochondria, in rat liver mitochondria  $\Delta p$  was not modified by the addition of  $K^+$ . When uncouplers were added to mitochondria from either source, the synthesis of ATP was completely inhibited.

Both safranine-O and TPP<sup>+</sup> indicate that  $K^+$  modi-

fied a large decrease in  $\Delta p$  when added to mitochondria in the presence of low concentrations of phosphate. However, the large dilution factor (130%) employed to calculate the uptake of TPP<sup>+</sup> in 1 mg of mitochondria magnified the radioactivity differences at low  $\Delta p$ s; this resulted in large standard deviations (Table II, column 1). Using an alternative method for calculation of the  $\Delta p$ , which has been described for liver mitochondria (29), resulted in smaller standard deviations. However, this method reported the presence of a low  $\Delta p$  even in the uncoupled state and thus the absolute numbers at the lower  $\Delta p$ s may not be exact. In contrast, the  $\Delta p$  reported by safranine-O was very repetitive under each condition tested. Furthermore, it was in agreement with the  $\Delta p$  variations obtained with TPP<sup>+</sup> when using the first method. Therefore, we decided to use the safranine-O values to calculate the  $\Delta p$  (Table III).

Our data indicate that in the absence of a high  $\Delta p$ , yeast mitochondria are capable of synthesizing ATP through some alternative mechanism. The possible alternative mechanisms have been analyzed in extreme alkaliphilic bacteria, where ATP synthesis has been detected even in the presence of an inverted  $\Delta pH$  (alkaline outside). These mechanisms may include the existence of protein-protein interactions or the availability of localized proton pools (12, 13).

Under the conditions where yeast mitochondria were sensitive to  $K^+$ , the rate of ATP synthesis was about 30% of the maximum rate, attainable in the presence of high phosphate and magnesium. This maximum rate was similar to the values reported in the literature (33). At either 0.4 or 4 mM phosphate,  $K^+$  had a slight stimulatory effect on oxidative phosphorylation, decreasing the  $K_m$ . Furthermore, at 4 mM phosphate, the  $V_{max}$  was increased (Fig. 4). Stimulation of the synthesis of ATP by  $K^+$  probably occurs due to direct stimulation of the activities of the mitochondrial respiratory chain and the  $F_1F_0$ ATPase (33).

Probably the low concentrations of  $Mg^{2+}$  and phosphate used here are never reached in the cell and thus the effects of  $K^+$  are not physiological. However, the  $K^+$  effects on the  $\Delta p$  and their titration by increasing concentrations of phosphate may provide a useful tool to explore the dependence of different energy-dependent processes on  $\Delta p$ , without using exogenous inhibitors, uncouplers, or decouplers.

The synthesis of ATP observed in yeast mitochondria at low  $\Delta p$  was not a result of the activity of adenylate kinase. In the presence of oligomycin, the synthesis of ATP by yeast mitochondria was very low (Fig. 5). This is in agreement with data indicating that in yeast, most of the adenylate kinase activity is located in the cytoplasm and is almost absent in mitochondria (38).

In yeast mitochondria,  $K^+$  induces swelling depending on the presence of a respiratory substrate or ATP and this process is inhibited by phosphate (19,

20). The  $K^+$ -mediated swelling did not disrupt mitochondria because the subsequent addition of phosphate reestablished the  $\Delta\psi$  (Fig. 2).

There are reports indicating that  $Mg^{2+}$  and ADP inhibit the uptake of  $K^+$  by mitochondria from different sources (14–20). However, the presence of  $Mg^{2+}$ , ADP, hexokinase, glucose-6-phosphate dehydrogenase, and NADP<sup>+</sup>, at the maximal concentrations used here, did not interfere with the effects of  $K^+$  on  $\Delta\psi$  (results not shown).

In contrast with the synthesis of ATP, the uptake of calcium by yeast mitochondria is inhibited by  $K^+$  or  $Na^+$  at the same concentrations used here (23). Thus, while the uptake of  $Ca^{2+}$  seems to be completely dependent on the bulk  $\Delta\psi$  (23), the synthesis of ATP continued at low  $\Delta\psi$ , suggesting that in yeast mitochondria there is an alternate mechanism for the transfer of protons from the respiratory chain to the  $F_1F_0$ ATPase.

#### ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank the technical assistance of Jorge Sepúlveda and Rosalva Paredes.

#### REFERENCES

- Mitchell, P. (1981) *Nature* **291**, 144–149.
- Mitchell, P. (1986) *Biol. Rev.* **45**, 445–502.
- Stator, E. C. (1971) *Eur. J. Biochem.* **196**, 499–504.
- Stewart, M. A., Beech, J. A., and Stator, E. C. (1986) *Biochim. Biophys. Acta* **848**, 279–287.
- Salvach, J., Basile, J., Thodenmann, G., Osterhoff, D., and Dierker, N. A. (1994) *Nature* **370**, 379–382.
- Antonczak, T. N., Kucharski, D. N., and Yagcioglu, L. S. (1993) *Biochim. Biophys. Acta* **1136**, 35–40.
- Prato, M., Tricot, J., and Tesson, J. F. (1988) *Nature* **335**, 738–739.
- Qui, Z. H., Yu, L., and Yu, C. A. (1993) *Biochemistry* **32**, 3207–3212.
- Gupta, S. S., Chantre, R., Lemstra, M. A., and Hackenbrock, C. R. (1991) *Biochim. Biophys. Acta* **1069**, 131–138.
- Chiang, H., and DeGuz, E. A. (1987) *Biochemistry* **26**, 6711–6716.
- Goffanti, A. A., and Kirsch, T. A. (1984) *J. Biol. Chem.* **259**, 23378–23382.
- Hicks, D. R., and Kirsch, T. A. (1985) *Biochim. Biophys. Acta* **801**, 214.
- Kirsch, T. A. (1985) *Mol. Microbiol.* **13**, 401–410.
- Goffanti, A. A. (1988) in *Integration of Mitochondrial Function* (Lemstra, M. A., Hackenbrock, C. R., Thomsen, R. G., and Wackerhoff, H. V., Eds.), pp. 239–250. Plenum, New York.
- Berkeley, G. P., Bayard, K., and Jung, D. W. (1984) *J. Bioenerg. Biomembr.* **16**, 219–226.
- Falwell, E., Costa, G., and Dixon, J. J. (1985) *Biochemistry* **24**, 3210–3219.
- Pisani, P., Minerva, G., Mahdi, F., Beavis, A. D., Waidenberger, G., and Goffanti, A. A. (1985) *J. Biol. Chem.* **260**, 30902–30909.
- Wellenda, A. A., Trumbly, R. J., Goffanti, A. A., and Beavis, A. D. (1991) *Biochim. Biophys. Acta* **1144**, 367–373.
- Mason, S., and Goffanti, A. A. (1991) *J. Bioenerg. Biomembr.* **13**, 471–478.
- Goffanti, A. A., Bassett, G., Simpson, V., and Sigurdson, M. (1990) *J. Biol. Chem.* **265**, 25496–25415.
- Belluco, C., and Sanguis, K. (1991) *J. Biol. Chem.* **266**, 10192–10200.
- De Khat, S. H., Van Wierenkerken, H. K. A., and Koenigshagen, V. V. (1981) *Biochim. Biophys. Acta* **67**, 135–145.
- Urbis, S., Sengul, F., and Pardo, J. F. (1992) *Cell Calcium* **13**, 211–217.
- Pina, A., Pina, H. J., Escamez, E., and Pina, E. (1977) *FEBS Lett.* **66**, 209–212.
- Garnal, G. A., Barstow, J. C., and David, M. M. (1980) *J. Biol. Chem.* **255**, 731–736.
- Urbis, S., Okada, S. Y., Sengul, F., and Dierker, T. (1987) *Biochim. Biophys. Acta* **924**, 87–90.
- Savolainen-Molina, A., Urbis, S., and Dierker, T. M. (1990) *Biochim. Biophys. Res. Commun.* **167**, 149–153.
- Alexander, K. E. O., and Whetton, R. F. (1976) *FEBS Lett.* **69**, 191–197.
- Ruttenberg, H. (1984) *J. Muscle Biol.* **41**, 127–139.
- Mason, S., Casarelli-Mazzoni, D., and Mazzoni, U. (1991) *J. Bioenerg. Biomembr.* **13**, 217–224.
- Jung, D. W., Davis, M. W., and Berkeley, G. P. (1980) *Arch. Biochem. Biophys.* **189**, 19–26.
- Ruttenberg, H. (1979) *Methods Enzymol.* **55**, 547–560.
- Urbis, S., Simchen, N., and Pina, A. (1991) *Biochim. Biophys. Acta* **1074**, 415–424.
- Goffanti, A. A., Wagner, M., Kaprielian, M., Wacker, U., and Bevilacqua, D. (1985) *Biochim. Biophys. Acta* **1148**, 217–227.
- Pisani, P., Sigurdson, M., Oshida, K., and Goffanti, A. A. (1986) *Biochemistry* **25**, 6031–6036.
- Ruttenberg, H. (1980) *Biochim. Biophys. Acta* **618**, 1–17.
- Ruttenberg, H. (1981) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **78**, 3213–3217.
- Klein, H., Hagelstein, V., Schrecker, S., Strobel, G., Lettgenbach, F., and Hoeslter, W. (1986) *Biochim. Biophys. Acta* **1066**, 251–256.

## ANEXO 3

## Interactions of arsenate, sulfate and phosphate with yeast mitochondria

Paulina Cortés, Vicente Castrejón, José G. Sampedro, Salvador Uribe \*

Department of Biochemistry, Institute of Physiology, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM),  
Apdo Postal 70-242, 04510 México City, México

Received 15 July 1999; received in revised form 9 November 1999; accepted 15 November 1999

### Abstract

In the presence of  $K^+$ , addition of ATP or ethanol to yeast mitochondria triggers the depletion of the transmembrane potential ( $\Delta\psi$ ) and this is prevented by millimolar concentrations of phosphate ( $PO_4$ ). Different monovalent and polyvalent anions were tested for their protective effects on mitochondria from *Saccharomyces cerevisiae*. Only arsenate ( $AsO_4$ ) and sulfate ( $SO_4$ ) were as efficient as  $PO_4$  to protect mitochondria against the  $K^+$  mediated swelling, depletion of the  $\Delta\psi$ , and decrease in the ratio of uncoupled state to state 4 respiration rates. Protection by  $PO_4$ ,  $SO_4$  or  $AsO_4$  was inhibited by mersalyl, suggesting that these anions interact with a site located in the matrix side. In addition, the effects of  $SO_4$  and  $AsO_4$  on the  $F_1F_0$ -ATPase were tested: both  $SO_4$  and  $AsO_4$  inhibited the synthesis of ATP following competitive kinetics against  $PO_4$  and non-competitive kinetics against ADP. The mersalyl sensitive uptake of  $^{32}PO_4$  was not inhibited by  $SO_4$  or  $AsO_4$ , suggesting that the synthesis of ATP was inhibited at the  $F_1F_0$ -ATPase. The hydrolysis of ATP was not inhibited, only a stimulation was observed when  $AsO_4$  or sulfate ( $SO_4$ ) were added. It is suggested that the structure and charge similarities of  $PO_4$ ,  $AsO_4$  and  $SO_4$  result in indiscriminate binding to at least two sites located in the mitochondrial matrix: at one site, occupation by any of these three anions results in protection against uncoupling by  $K^+$ ; at the second site, in the  $F_1F_0$ -ATPase,  $AsO_4$  and  $SO_4$  compete for binding against  $PO_4$ , leading to inhibition of the synthesis of ATP. © 2000 Elsevier Science B.V. All rights reserved.

**Keywords:** Arsenate; ATP synthesis;  $F_1F_0$ -ATPase; Phosphate; Permeability transition pore; Sulfate; Yeast mitochondria

### 1. Introduction

In mammalian mitochondria,  $Ca^{2+}$  overload trig-

gers the opening of a large, unspecific conductance pathway termed the permeability transition pore (PTP) and leads, in depletion of the transmembrane potential ( $\Delta\psi$ ) [1–3]. The role of PTP in physiological apoptosis or in pathological conditions such as cell death due to ischemia-reperfusion has been discussed [1]. In *Saccharomyces cerevisiae*, the yeast mitochondria uncoupled channel (YMUC) is a counterpart of the PTP [4]. However, the PTP and the YMUC are regulated differently: in mammalian mitochondria, the PTP is inhibited by ATP while it is opened by inorganic phosphate ( $PO_4$ ) [1–4], while in yeast the opposite effects are observed, i.e., the YMUC is in-

Abbreviations:  $AsO_4$ , inorganic arsenate; CCCP, carbonyl cyanide *m*-chlorophenylhydrazone; MES, mesophthalimethanesulfonic acid; NEM, N-ethylmaleimide;  $PO_4$ , inorganic phosphate; PT, permeability transition; PTP, permeability transition pore;  $SO_4$ , inorganic sulfate;  $SO_3$ , inorganic sulfite; UFA, uncoupled state/state 4 ratio; YMUC, yeast mitochondria uncoupled channel;  $\Delta\psi$ , transmembrane potential.

\* Corresponding author. Fax: +52 (1) 525930.  
E-mail: uribe@ibiohd.unam.mx

0968-2728/00/\$ - see front matter © 2000 Elsevier Science B.V. All rights reserved.  
PII: S0968-2728(99)00109-7

closed by ATP and locked in the closed position by  $P_i$  [4]. Furthermore, neither  $Ca^{2+}$  nor cyclosporin, which is a PTP inducer and inhibitor, respectively [3], seems to have any effects on YMUC [4].

Thus  $PO_4$ , the most abundant polyvalent anion in the cell, plays at least two vital roles in the matrix of mitochondria: (i) as a substrate in the phosphorylation of ADP by the  $F_1F_0$ -ATPase [5] and (ii) as a mitochondrial membrane permeability modulator during cation uptake [6–8]. In this regard, it has been reported that the addition of  $PO_4$  results in an increase in the uptake of  $Ca^{2+}$  both in mammalian [9,10] and in yeast mitochondria [11].

In diverse biological systems, arsenate ( $AsO_4$ ) and/or sulfate ( $SO_4$ ) may compete against, or substitute for,  $PO_4$  [12]. In many enzymes  $AsO_4$  substitutes for  $PO_4$ , leading to products which are rapidly hydrolyzed [13]. Among the best known cases is the one catalyzed by D-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase [13,14]. In mitochondria,  $AsO_4$  reacts with ADP in a  $F_1F_0$ -ATPase catalyzed arylation, yielding an easily hydrolyzable product and uncoupling oxidative phosphorylation [13,15–17].  $AsO_4$  is also known to compete for the  $PO_4$  transport system in *Sarcoscyces granaticolor* [18]. During the synthesis of cytosine in *Euglena* mitochondria,  $SO_4$  is activated to yield adenosine 3'-phosphate 3'-phosphosulfate in a  $PO_4$  sensitive process [19].

In *S. cerevisiae*,  $PO_4$  protects mitochondria during exposure to  $K^+$  [4]. In the absence of  $PO_4$  and in the presence of high concentrations of  $K^+$ , addition of ATP or ethanol leads to massive mitochondrial swelling and  $\Delta p$  depletion [4,20,21]. Addition of  $PO_4$  in the millimolar range prevents both swelling and  $\Delta p$  depletion [4,22]. In contrast to the mammalian organelle, yeast mitochondria are protected by millimolar concentrations of  $PO_4$  without the need of further additions [4,23].

Different anions were tested in yeast mitochondria for their protection activity against the  $K^+$  mediated effects on swelling or  $\Delta p$ . Mersalyl sensitive protection by  $PO_4$ ,  $SO_4$  and  $AsO_4$  was observed. In addition  $SO_4$  and  $AsO_4$  inhibited the ATP synthesis. It is suggested that the structural similarities between  $PO_4$ ,  $SO_4$  and  $AsO_4$  result in specific interaction with at least two different binding sites inside the matrix of yeast mitochondria: occupation of a site which controls YMUC conductance by  $PO_4$ ,  $SO_4$  or

$AsO_4$  results in protection against  $K^+$ ; in addition, binding to the  $PO_4$  binding site in the  $F_1F_0$ -ATPase results in competitive inhibition of the synthesis of ATP by  $SO_4$  or  $AsO_4$ .

## 2. Materials and methods

### 2.1. Materials

All reagents were of the highest purity available commercially. Glucose, mannitol, morpholinocarbonylsulfonic acid (MES), safranine-O, hexokinase and  $\beta$ -nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADP<sup>+</sup>) were from Sigma (St. Louis, MO). Lyophilized glucose-6-phosphate dehydrogenase was from Worthington Biochem (NJ). Ammonium sulfate, phosphoric acid and sulfuric acid were from Baker (Mexico City). Mersalyl was a kind gift from Dr. Edmundo Chávez (National Institute of Cardiology, Mexico City). The radioactive isotope  $^{32}P$  was from New England Nuclear (Dupon, DE).

### 2.2. Biologicals

Baker's yeast *S. cerevisiae* was purchased from a local yeast factory (La Artesa, SA). The cells were grown by suspending 40 g of cells (w/w) in 1 l of a rich liquid medium [24] and aerating (1 l/min) for 8 h at 30°C. The cells were centrifuged twice in a refrigerated centrifuge (Sorvall, RSB) at 4000  $\times$  g for 5 min, resuspended in 1 l of water and starved for 18 h under aeration at 30°C [23].

### 2.3. Isolation of mitochondria

After incubation, yeast were centrifuged (4000  $\times$  g for 5 min, twice) and resuspended in 0.6 M mannitol, 5 mM MES, 0.1% bovine serum albumin, pH 6.8 (TEA) at a final concentration of 0.5 g (w/w)/ml. The cell suspension was poured into a Braun homogenizing glass and mixed with 50% (v/v) of 0.5 mm diameter glass beads. Homogenization was performed for 12 s and the resulting suspension was decanted into centrifuge tubes. From the homogenate, mitochondria were isolated by differential centrifugation as described before [25]. Mitochondrial protein was determined by the Bioassay method [26].



#### 2.4. Transmembrane potential ( $\Delta\psi$ )

The  $\Delta\psi$  was determined as described by Akerman and Wikström [27], following the changes in absorbance of safranin-O at 511–553 nm in a double beam spectrophotometer (SLM-Aminco DW2000, Urbana, IL) in dual mode.

#### 2.5. Mitochondrial swelling

Experiments were performed by following the decrease in absorbance of a mitochondrial suspension in a DW2000 spectrophotometer in split mode at a wavelength of 550 nm.

#### 2.6. Oxygen consumption

The rate of oxygen consumption was measured in a closed water jacketed glass chamber equipped with a Clark electrode connected to an oscilloscope (Ysi-500) and to a chart recorder. The temperature was maintained at 30°C with a circulator bath (Haskel). Other additions were as indicated under each experiment. Mitochondria (0.5 mg protein) were added and oxygen consumption in the resting state (state 4) was recorded. After approx. 2 min, 4  $\mu$ M FCCP was added and the rate of oxygen consumption in the uncoupled state was measured.

#### 2.7. ATP synthesis

The rate of ATP synthesis was measured using an enzyme coupled assay following the reduction of NADP<sup>+</sup> at 340–390 nm in a DW2000 spectrophotometer in the dual mode [28]. The lyophilized enzymes were resuspended each day as follows: hexokinase was resuspended in water to 13 mg/ml. Glucose-6-phosphate dehydrogenase was resuspended in 5 mM citrate pH 7.0 to a final concentration of 1000 U/ml. AMP was not added because in yeast mitochondria the adenylate kinase activity is minimal [22,29].

#### 2.8. ATPase activity

ATP hydrolysis was determined by measuring the production of orthophosphate as described by Fiske and Subbarow [30]. The reaction mixture contained

20 mM Tris-HCl pH 8.5 plus 5 mM MgCl<sub>2</sub>. After temperature equilibration at 30°C, mitochondria were added to a final concentration of 0.25 mg protein and incubated for 10 min under mild agitation in a water bath (New Brunswick agitation bath); then the reaction was stopped with 0.1 ml of 30% trichloroacetic acid.

#### 2.9. <sup>32</sup>P O<sub>2</sub> uptake by mitochondria

The uptake of <sup>32</sup>P O<sub>2</sub> was measured in the presence of different anions [31]. Mitochondria were incubated for 2 min at 25°C in a gyratory water bath (New Brunswick) and then a 100  $\mu$ l aliquot was withdrawn and vacuum filtered through a 0.4  $\mu$ m pore diameter Millipore filter. The sample was washed immediately with 100 mM NaHPO<sub>4</sub>, pH 6.8, three times. The filters were allowed to dry and then they were transferred to scintillation vials and 5 ml of scintillation liquid was added. Vials were introduced in a Beckman LS6500 multipurpose scintillation counter using the phosphor program. The uptake of PO<sub>4</sub> in nmol (mg protein)<sup>-1</sup> is reported.

### 3. Results

In the presence of high K<sup>+</sup> concentrations, addition of ATP or ethanol to isolated yeast mitochondria results in swelling and  $\Delta\psi$  depletion [4,32]. Increasing concentrations of PO<sub>4</sub> both prevent and revert the K<sup>+</sup> mediated effects [32]. It was decided to analyze whether other anions protected yeast mitochondria to a comparable extent. The  $\Delta\psi$  protection effects of diverse salts of acetate, nitrate, SO<sub>4</sub>, SO<sub>3</sub>, AsO<sub>4</sub> and PO<sub>4</sub> were measured at a final concentration of 4 mM (Table 1). As expected [22,32], the  $\Delta\psi$  reached the maximum detectable values either in the absence of K<sup>+</sup> and 0–0.4 mM PO<sub>4</sub>, or in the presence of 4 mM PO<sub>4</sub>, with or without K<sup>+</sup>. In contrast, in the presence of 40 mM KCl and low PO<sub>4</sub> the  $\Delta\psi$  was minimal and varied with the addition of different anions as follows: Na<sup>+</sup>-AsO<sub>4</sub> and all the SO<sub>4</sub> salts tested generated a  $\Delta\psi$  as high as the one observed with 4 mM PO<sub>4</sub>. The NH<sub>4</sub><sup>+</sup> salts of acetate, nitrate or chloride resulted in a small  $\Delta\psi$ , up to 40 mV. Na<sup>+</sup>-acetate, Na<sup>+</sup>-nitrate and Na<sup>+</sup>-SO<sub>4</sub> did not protect the  $\Delta\psi$  (Table 1).

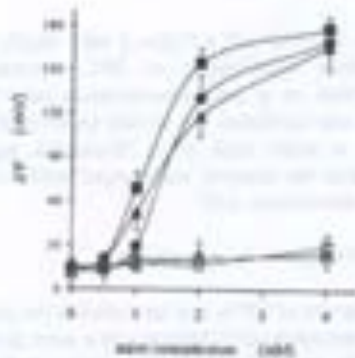


Fig. 1. Effects of increasing concentrations of phosphate, arsenate or sulfate on the transmembrane potential of yeast mitochondria. Modulation by mersalyl. Experimental conditions as in Table 1, except 40 mM KCl. The indicated concentrations of anions were added from a 1 M stock solution. Mersalyl was always added at a final concentration of 100  $\mu$ M per mg protein. When mersalyl was added, mitochondria were incubated 30 s before adding the anion. Anions were:  $\bullet$ ,  $\text{PO}_4$ ;  $\square$ , mersalyl- $\text{PO}_4$ ;  $\blacktriangle$ ,  $\text{SO}_4$ ;  $\triangle$ , mersalyl- $\text{SO}_4$ ;  $\blacksquare$ ,  $\text{AsO}_4$ ;  $\square$ , mersalyl- $\text{AsO}_4$ . Data are the mean of three duplicate determinations and bars represent standard deviations.

The  $\Delta\psi$  was protected by 4 mM  $\text{PO}_4$ ,  $\text{SO}_4$  or  $\text{AsO}_4$  to the same extent. In order to define the concentration dependence of the protection effect, the same parameter ( $\Delta\psi$ ) was measured at different concentrations of  $\text{PO}_4$ ,  $\text{SO}_4$  and  $\text{AsO}_4$ . In addition, in order to determine the mitochondrial compartment where the anion protected, experiments were conducted both in the presence and in the absence of the  $\text{PO}_4$  transport inhibitor mersalyl (Fig. 1). In the absence of anions, the  $\Delta\psi$  was very low and increased with the concentration of each of the three anions. The increase in  $\Delta\psi$  was always slightly higher for  $\text{PO}_4$  than for comparable concentrations of  $\text{SO}_4$  or  $\text{AsO}_4$  (Fig. 1). When the same experiments were performed in the presence of mersalyl, the anion protection was eliminated, such that at 4 mM anion the  $\Delta\psi$  was between 24 and 29 mV (Fig. 1). Two conclusions are suggested by the results reported in Fig. 1: first,  $\text{SO}_4$  and  $\text{AsO}_4$  enter the matrix using a transport system which is similar to the  $\text{PO}_4$  transporter, at least in its sensitivity to mersalyl, and second,  $\text{PO}_4$ ,  $\text{SO}_4$  and  $\text{AsO}_4$  protect the  $\Delta\psi$  from inside the mitochondrial matrix.

The above results suggested that the anions protect

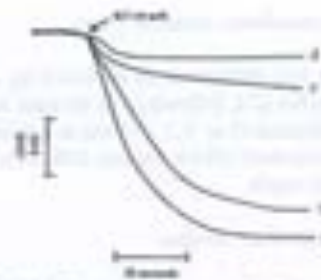


Fig. 2. Effect of  $\text{PO}_4$  on the  $\text{K}^+$  promoted swelling of yeast mitochondria. Modulation by mersalyl. Experimental conditions as in Fig. 1 except no substrate D was added. (a) No addition; (b) 4 mM  $\text{PO}_4$  plus 100  $\mu$ M mersalyl; (c) 4 mM  $\text{PO}_4$ ; (d) 4  $\mu$ M CCCP. Where indicated, 40 mM KCl was added from a 1 M stock solution. Measurements were performed at room temperature, in a DW2000 Atomic Spectrophotometer in split mode at 510 nm.

Table 1

Effect of different anions on the  $\text{K}^+$  mediated transmembrane potential ( $\Delta\psi$ ) depletion in isolated yeast mitochondria

Addition	$\Delta\psi$ (mV)
None	178 $\pm$ 2
$\text{K}^+$	3 $\pm$ 6
$\text{K}^+$ + TEA- $\text{PO}_4$	174 $\pm$ 11
$\text{K}^+$ + Na- $\text{PO}_4$	151 $\pm$ 27
$\text{K}^+$ + Na- $\text{SO}_4$	150 $\pm$ 13
$\text{K}^+$ + Tris- $\text{SO}_4$	141 $\pm$ 5
$\text{K}^+$ + Na- $\text{SO}_4$	160 $\pm$ 9
$\text{K}^+$ + Na- $\text{AsO}_4$	144 $\pm$ 26
$\text{K}^+$ + $\text{NH}_4$ - $\text{NO}_2$	43 $\pm$ 13
$\text{K}^+$ + $\text{NH}_4$ -Ac	44 $\pm$ 11
$\text{K}^+$ + $\text{NH}_4$ -Cl	38 $\pm$ 10
$\text{K}^+$ + Na-Ac	5 $\pm$ 3
$\text{K}^+$ + Na- $\text{SO}_4$	8 $\pm$ 10
$\text{K}^+$ + Na- $\text{CO}_3$	0 $\pm$ 0

Reaction mixture: 0.5 M mannitol, 7 mM MES, pH 6.3 (TEA) 0.4 mM  $\text{PO}_4$  buffer, pH 6.3 (TEA), 0.2 mM  $\text{MgCl}_2$ , 1  $\mu$ M rotenone, 20  $\mu$ M substrate-D, 0.5 mg mitochondrial protein. Additions:  $\text{K}^+$  was 40 mM KCl. The indicated anion salt was always 4 mM; depending of the salt, the pH was always adjusted in the stock solutions to 6.3 using NaOH,  $\text{NH}_4\text{OH}$ , TEA, Tris or HCl as usual. Final volume 2 ml, temperature 22°C. At the end of each run, 4  $\mu$ M FCCP was added to determine absorbance at 0 mV. Absorbance changes were followed in a DW2000 Atomic spectrophotometer in dual mode at 511–515 nm. Results are the mean of three determinations  $\pm$  S.D.

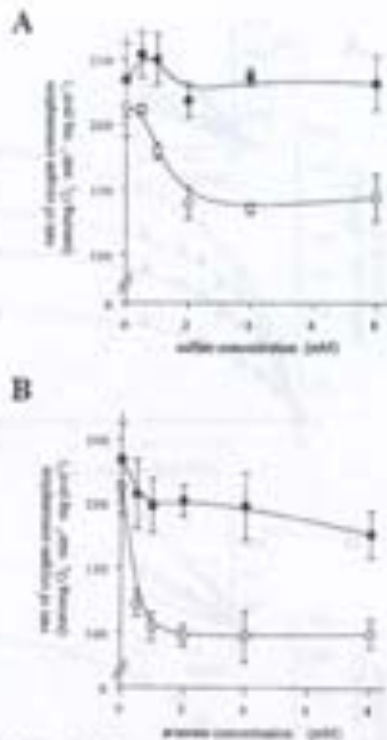


Fig. 3. Effect of different concentrations of sulfite or arsenite on the rate of oxygen consumption by yeast mitochondria. Experimental conditions as in Table 1 except 40 mM KCl. Temperature was maintained at 37°C. (A)  $\text{SO}_3^{2-}$ . (B)  $\text{AsO}_3^{3-}$ .  $\square$ , state 4;  $\blacksquare$ , uncoupled state, generated with 4  $\mu\text{M}$  CCCP. Data are the means of three duplicate determinations. Bars represent standard deviation.

from the mitochondrial matrix. This was further explored by measuring the pattern of  $\text{K}^+$  mediated mitochondrial swelling in the absence and in the presence of mercury. In the absence of anions, addition of 40 mM KCl resulted in rapid swelling (Fig. 2a). Swelling was prevented in the presence of 4 mM  $\text{AsO}_3^{3-}$  (Fig. 2d). Addition of mercury to the incubation mixture prevented the  $\text{AsO}_3^{3-}$  mediated effect (Fig. 2b). In the presence of an uncoupler no swelling was detected, demonstrating that the  $\text{K}^+$  mediated swelling is an energy dependent process (Fig. 2c). The same pattern of swelling effects was observed when  $\text{SO}_3^{2-}$  or  $\text{PO}_4^{3-}$  (results not shown) [18,31] were used instead of  $\text{AsO}_3^{3-}$ .

The  $\text{K}^+$  mediated mitochondrial swelling and  $\Delta\psi$  depletion were prevented by  $\text{SO}_3^{2-}$  and  $\text{AsO}_3^{3-}$ , suggesting that these anions resemble  $\text{PO}_4^{3-}$  in their membrane protection properties. Thus, the effects of increasing concentrations of  $\text{SO}_3^{2-}$  or  $\text{AsO}_3^{3-}$  on the rate of oxygen consumption in state 4 and in the uncoupled state were explored in the presence of

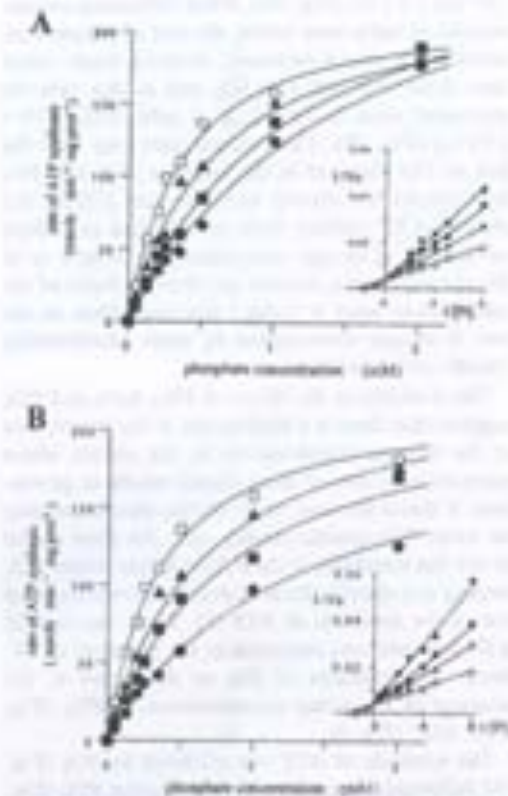


Fig. 4. Inhibition kinetics of the rate of synthesis of ATP by different concentrations of sulfite or arsenite in the presence of increasing concentrations of phosphate. Experimental conditions as in Table 1. The coupled coupled assay for ATP required the addition of 162.5  $\mu\text{g/ml}$  bovine serum albumin, 2  $\mu\text{M}$  glucose-6-phosphate dehydrogenase, 20 mM glucose and 1.4 mM NADP<sup>+</sup>. The reaction was started by adding 40 mM ADP. The induced state was added in different final concentrations as follows:  $\square$ , no addition;  $\blacktriangle$ , 2 mM;  $\blacksquare$ , 4 mM;  $\blacklozenge$ , 8 mM. (A) Sulfite; inset: double reciprocal plot of A. (B) arsenite; inset: double reciprocal plot of B.

80 mM KCl (Fig. 3). In the control, without  $\text{PO}_4$ ,  $\text{SO}_4$  or  $\text{AsO}_4$ , the rate of oxygen consumption in state 4 was very high and it increased only slightly after the addition of an uncoupler, resulting in an uncoupled/state 4 ratio (U/4) of  $1.1 \pm 0.1$  (Fig. 3). As increasing concentrations of  $\text{SO}_4$  were added, the rate of oxygen consumption in state 4 decreased while the rate of oxygen consumption in the uncoupled state was nearly constant; at 4 mM  $\text{SO}_4$ , U/4 was  $1.8 \pm 0.1$  (Fig. 1A). When increasing concentrations of  $\text{AsO}_4$  were added, the rate of oxygen consumption in state 4 decreased, reaching lower values than those observed with  $\text{SO}_4$  and in this case the uncoupled state decreased; at 4 mM  $\text{AsO}_4$ , U/4 =  $2.0 \pm 0.2$  (Fig. 3B). These values were very near the U/4 of 1.83 obtained in the presence of 4 mM  $\text{PO}_4$  here (results not shown) and elsewhere [22]. In the absence of  $\text{K}^+$ , neither  $\text{AsO}_4$  nor  $\text{SO}_4$  had any effects on the rate of oxygen consumption in state 4 or in the uncoupled state (results not shown). None of the other anions listed in Table 1 had any effects on the rate of oxygen consumption by yeast mitochondria (results not shown).

The similarity in the effects of  $\text{SO}_4$ ,  $\text{AsO}_4$  and  $\text{PO}_4$  suggests that there is a binding site in the matrix face of the internal membrane or in the matrix whose occupation by any of these anions results in protection. If this is the case, these anions should compete for other  $\text{PO}_4$ -specific binding sites. An ideal model to test this possibility is the  $\text{F}_1\text{F}_0$ -ATPase, where  $\text{PO}_4$  binding at a specific site in each  $\alpha$ - $\beta$  dimer is required during the synthesis of ATP [5]. Thus, the rate of ATP synthesis was measured in the presence of different concentrations of  $\text{SO}_4$  or  $\text{AsO}_4$  and in the presence of increasing concentrations of  $\text{PO}_4$  (Fig. 4) or ADP (Fig. 5).

The synthesis of ATP was inhibited by  $\text{SO}_4$  (Fig. 4A) following competitive kinetics against  $\text{PO}_4$  (Fig. 4A, insert) such that the  $V_{\text{max}}$  was maintained at, or very near, the value of  $251 \text{ nmol ATP (min} \times \text{mg prot)}^{-1}$  obtained in the absence of  $\text{SO}_4$ , while the apparent  $K_m$  increased with the  $\text{SO}_4$  concentration, from 0.45 mM  $\text{PO}_4$  in the control up to 1.29 mM  $\text{PO}_4$  in the presence of 8 mM  $\text{SO}_4$  (Fig. 4A, insert). In the presence of increasing concentrations of  $\text{AsO}_4$  the same pattern of inhibition was observed (Fig. 4B) and the  $V_{\text{max}}$  also remained near the control value of  $251 \text{ nmol ATP (min} \times \text{mg prot)}^{-1}$  while the apparent

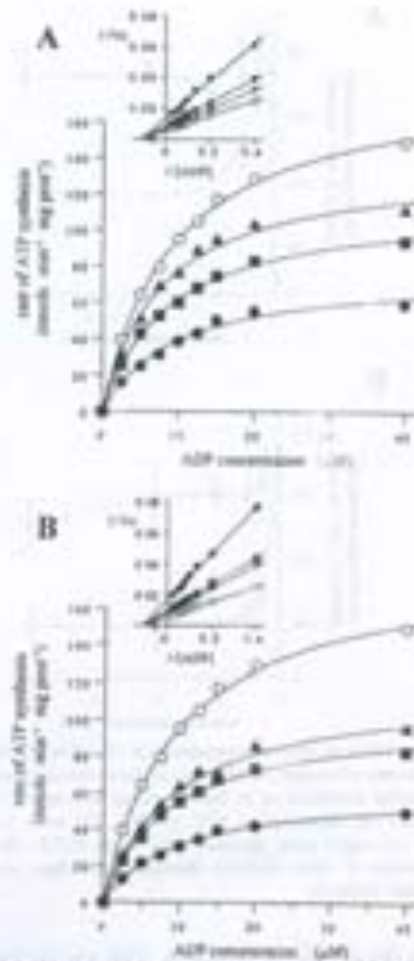


Fig. 5. Inhibition kinetics of the rate of synthesis of ATP by different concentrations of sulfate or arsenate in the presence of increasing concentrations of ADP. Conditions were as in Fig. 4, except  $\text{PO}_4$  was always 1 mM while ADP was varied as indicated. Anion concentrations were:  $\circ$ , no addition;  $\bullet$ , 2 mM;  $\blacksquare$ , 4 mM;  $\blacktriangle$ , 8 mM. (A) Sulfate; insert: double reciprocal plot of A; (B) arsenate; insert: double reciprocal plot of B.

$K_m$  increased up to 1.35 mM  $\text{PO}_4$  at 8 mM  $\text{AsO}_4$  (Fig. 4B, insert).

The  $\text{SO}_4$  or  $\text{AsO}_4$  mediated inhibition of the synthesis of ATP was assayed in the presence of increasing concentrations of ADP (Fig. 5). In the presence of different concentrations of  $\text{SO}_4$ , the synthesis of

**Table 2**  
Uptake of  $^{32}\text{P}\text{O}_4$  by yeast mitochondria: modulation by anions or by mersalyl

Addition	Phosphate uptake (nmol/mg prot/min)
None	1.34 ± 0.49
Na-AsO <sub>4</sub>	1.74 ± 0.25
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1.00 ± 0.16*
Na-SO <sub>3</sub>	2.11 ± 0.34
Tris-SO <sub>3</sub>	1.86 ± 0.06
Mersalyl	0.24 ± 0.04*

Reaction mixture: as in Table 1, except 1 mM  $\text{PO}_4$ , 20 μM  $\text{H}_2\text{O}_2$ , 2 mg mitochondrial protein. The indicated salt was always 4 mM. Where indicated, 100 μM mersalyl. Numbers are the means of three determinations ± S.D.

\* $P < 0.02$  versus the control as estimated using a two-tailed Student's *t*-test.

ATP was inhibited (Fig. 5A). Inhibition followed non-competitive kinetics against ADP, such that at 8 mM  $\text{SO}_4$  the  $V_{\text{max}}$  decreased more than two times, from 182 nmol ATP (min × mg prot)<sup>-1</sup> in the control, to 74 nmol ATP (min × mg prot)<sup>-1</sup> while the apparent  $K_m$  remained almost unchanged, with a value of 9.13 μM ADP in the control and 9.23 μM ADP in the presence of 8 mM  $\text{SO}_4$  (Fig. 5A, insert). Addition of  $\text{AsO}_4$  also inhibited the synthesis of ATP in the presence of increasing concentrations of ADP (Fig. 5B) following non-competitive kinetics (Fig. 5B, insert). In the presence of 8 mM  $\text{AsO}_4$  the  $V_{\text{max}}$  decreased to 60 nmol ATP (min × mg prot)<sup>-1</sup> while the apparent  $K_m$  of 9.07 μM ADP was very near the control value (Fig. 5B, insert).

In contrast to the  $\text{SO}_4$  or  $\text{AsO}_4$  mediated inhibition of the synthesis of ATP, the rate of ATP hydrolysis was not modified by any of the anions used in this study (results not shown). Furthermore, a slight acceleration in the ATPase activity by  $\text{SO}_4$  and by  $\text{AsO}_4$  was detected. The control ATPase was 266 nmol  $\text{PO}_4$  (min × mg prot)<sup>-1</sup>, and it increased to 380 nmol  $\text{PO}_4$  (min × mg prot)<sup>-1</sup> in the presence of  $\text{SO}_4$  and to 354 nmol  $\text{PO}_4$  (min × mg prot)<sup>-1</sup> in the presence of  $\text{AsO}_4$ .

To test whether the effects of  $\text{SO}_4$  and  $\text{AsO}_4$  on the synthesis of ATP were due to a direct effect on the enzyme or to an inhibition of  $\text{PO}_4$  transport, the effects of  $\text{SO}_4$  and  $\text{AsO}_4$  on the uptake of  $^{32}\text{P}\text{O}_4$  were measured (Table 2). Under our experimental conditions, neither  $\text{AsO}_4$  nor  $\text{SO}_4$  inhibited the uptake of  $\text{PO}_4$ . Furthermore, the  $\text{NH}_4^+$  salt of  $\text{SO}_3$  in-

creased the uptake of  $\text{PO}_4$  to about two times the uptake observed in the control. The uptake of  $\text{PO}_4$  was inhibited almost completely by mersalyl (Table 2).

#### 4. Discussion

Among a number of anions tested,  $\text{SO}_4$  and  $\text{AsO}_4$  were as efficient as  $\text{PO}_4$  [22,32] to protect isolated yeast mitochondria against the  $\text{K}^+$  mediated uncoupling effects. All three anions,  $\text{PO}_4$ ,  $\text{AsO}_4$  and  $\text{SO}_4$ , protected mitochondria against the depletion of  $\Delta\psi$ , the decrease in the U/R ratio of respiration rates and the swelling of the matrix. Anion protection was prevented by mersalyl, suggesting that the site of interaction for these anions was located in the mitochondrial matrix or in the inner face of the internal membrane. Also tested were the polyvalent anions nitrate and sulfate and the monovalent anions acetate and chloride, but none of these protected against the deleterious effects of  $\text{K}^+$ .

The mechanism for the  $\text{PO}_4$  mediated preservation of the  $\Delta\psi$  is still undefined; nonetheless, the high structural homology of  $\text{PO}_4$ ,  $\text{AsO}_4$  and  $\text{SO}_4$  and the lack of effects of other anions suggest that the spatial distribution of atoms and charges in these anions is important for their interaction with a specific binding site inside mitochondria. This putative  $\text{PO}_4$  binding site might be in the inner side of a large 400 pS ion channel located in the internal membrane which is closed by  $\text{PO}_4$  and opened by ATP [33]. Occupation of the anion binding site would result in protection against the  $\text{K}^+$  effects, regardless of whether the anion is  $\text{PO}_4$ ,  $\text{AsO}_4$  or  $\text{SO}_4$ .

The proposal that the structural similarities between  $\text{PO}_4$ ,  $\text{AsO}_4$  and  $\text{SO}_4$  resulted in indiscriminate binding to a specific site was supported by the interaction of these three anions with the well known  $\text{PO}_4$  binding site in the ATP synthase. Of all the anions tested here, only  $\text{AsO}_4$  and  $\text{SO}_4$  inhibited the synthesis of ATP, following competitive kinetics against  $\text{PO}_4$  and non-competitive kinetics against ADP.

In diverse biological systems, indiscriminate interactions of  $\text{PO}_4$ ,  $\text{SO}_4$  and/or  $\text{AsO}_4$  with specific binding sites have been documented. In glyceraldehyde-3- $\text{PO}_4$  dehydrogenase  $\text{AsO}_4$  substitutes for  $\text{PO}_4$ ,

yielding  $3\text{PO}_4$ -glycerol- $\text{AsO}_4$ , which rapidly hydrolyzes to  $3\text{PO}_4$ -glycerate plus  $\text{AsO}_4$ , eliminating a phosphorylation site in glycolysis [13,14]. There are many examples of soluble enzymes where  $\text{AsO}_4$  reacts in place of  $\text{PO}_4$  [13]. The  $F_1F_2$ -ATPase catalyzes the arylation of ADP to yield  $\text{ADP-AsO}_4$ , which is spontaneously hydrolyzed to  $\text{ADP} + \text{AsO}_4$  [13,15–17] promoting an atracyloside resistant, oligomycin sensitive uncoupling in mitochondria [15–17]. As a consequence of the rapid hydrolysis,  $\text{ADP-AsO}_4$  formation can be detected in submitochondrial particles but not in intact mitochondria [11].

Competition between  $\text{PO}_4$  and  $\text{SO}_4$  is illustrated in *Zagloba* mitochondria, where during the synthesis of cysteine,  $\text{SO}_4$  is activated on the outer surface of the inner mitochondrial membrane in an ATP-coupled reaction to yield adenosine 3'-phosphate 5'-phosphosulfate; in this system,  $\text{PO}_4$  inhibits the activation of  $\text{SO}_4$  following competitive kinetics [19]. In bacteria, inhibition of  $\text{PO}_4$  uptake by  $\text{AsO}_4$  and  $\text{SO}_4$  has been described [18]. In yeast mitochondria  $\text{AsO}_4$  inhibits the binding of  $^{32}\text{PO}_4$  to a proteolipid which is believed to be the  $\text{PO}_4$  carrier [14].

The  $\text{AsO}_4$ ,  $\text{SO}_4$  and  $\text{PO}_4$  mediated protection of mitochondria was inhibited by mersalyl as observed when measuring the  $\Delta\psi$  and the mitochondrial swelling suggesting that (i) each of these anions needs to be transported into the matrix in order to protect the organelle and (ii) the uptake of  $\text{AsO}_4$  and  $\text{SO}_4$  resembles the  $\text{PO}_4$  transporter, at least in its mersalyl sensitivity. In this regard, there is a report indicating that  $\text{AsO}_4$  and  $\text{PO}_4$  inhibit the uncoupled respiration in yeast mitochondria in a mersalyl sensitive fashion [15]. Furthermore, in *S. griseoviridis* [18] and probably in *Escherichia coli* [16]  $\text{PO}_4$  transport is inhibited by  $\text{AsO}_4$  or  $\text{SO}_4$  following competitive kinetics.

In regard to the inhibition of the synthesis of ATP by  $\text{AsO}_4$  or  $\text{SO}_4$ , this was due to direct interaction with the  $F_1F_2$ -ATPase and not to inhibition of the  $\text{PO}_4$  transporter because under our conditions,  $\text{AsO}_4$  and  $\text{SO}_4$  did not inhibit the mersalyl sensitive uptake of  $^{32}\text{PO}_4$ . This is in contrast to results indicating that  $\text{AsO}_4$  inhibits the binding of  $^{32}\text{PO}_4$  to the putative  $\text{PO}_4$  transporter protein [14]. It would be interesting to test higher concentrations of  $\text{AsO}_4$  or  $\text{SO}_4$  to define whether  $\text{PO}_4$  transport inhibition may be observed. Although the synthesis of ATP was inhibited,

the backwards reaction, i.e. the hydrolysis of ATP, was not affected by  $\text{SO}_4$  and it was even slightly accelerated by  $\text{AsO}_4$ . The other anions used in this study did not modify the activity of the  $F_1F_2$ -ATPase (results not shown) except for  $\text{SO}_4$ , which stimulated the hydrolysis of ATP in agreement with other reports [17–19].

For each anion, the  $\text{NH}_4^+$  salt always resulted in higher  $\Delta\psi$  than the  $\text{Na}^+$  or Tris salt. Furthermore,  $\text{NH}_4^+\text{-SO}_4$  enhanced the uptake of  $\text{PO}_4$  with respect to the control while the  $\text{Na}^+$  or Tris salts had no effect.  $\text{NH}_4^+$  probably has more effects on the  $\Delta\psi$  than in the  $\Delta\psi$  resulting in charge preservation [40].

Yeast mitochondria are a better model than mammalian mitochondria to study the effects of  $\text{PO}_4$ . In yeast mitochondria  $\text{PO}_4$  protects without the need to add nucleotides or  $\text{Mg}^{2+}$  [11]. In contrast, when mammalian mitochondria are exposed to high external  $\text{Ca}^{2+}$ , the addition of  $\text{PO}_4$  leads to the PT unless  $\text{Mg}^{2+}$  and ATP are added [9,10,12,13], making it difficult to evaluate the  $\text{PO}_4$  specific effects in mammals.

In mammalian mitochondria, the generation of large  $\text{Ca}^{2+}\text{-PO}_4$  insoluble aggregates in the mitochondrial matrix has been proposed to result in buffering of  $\text{Ca}^{2+}$  and protection of the  $\Delta\psi$  [9,10]. In yeast mitochondria, the generation of  $\text{K}^+\text{-PO}_4$  aggregates is not likely, as  $\text{K}^+$  is monovalent and in addition, 2–4 mM  $\text{PO}_4$  is sufficient to protect against the deleterious effects of 40 mM  $\text{K}^+$  [4,12]. Thus, at least in yeast mitochondria the mechanism of protection seems to involve association with a specific binding site in the organelle and not to anion-cation interaction. The putative binding site where protection is mediated has similar binding specificity to the  $\text{PO}_4$  binding site in the  $F_1F_2$ -ATPase.

#### Acknowledgements

This work was partially supported by grants IN229798 from DGAPA-UNAM and 27568-N from SEP-CONACYT. PC is a Fundación UNAM fellow. The authors thank Dr. Edmundo Cháver for helpful discussions and for the gift of the reagent mersalyl. The technical assistance of Ramón Méndez is acknowledged.

## References

- [1] T.J. Górriz, D.R. Pfeiffer, Mechanisms by which mitochondrial transport ceases, *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 258 (1980) C775–C786.
- [2] M. Crampton, The mitochondrial permeability transition pore and its role in cell death, *Biochem. J.* 301 (1995) 231–249.
- [3] J.J. Lemasters, A.L. Niemann, T. Quinn, L.C. Trout, S.P. Elmore, Y. Nishimura, R.A. Cross, W.E. Casida, C.A. Bouldner, D.A. Brenner, R. Therman, The mitochondrial permeability transition in cell death: a common mechanism in neurons, apoptosis and oncology, *Biochim. Biophys. Acta* 1366 (1998) 177–196.
- [4] S. Mason, X. Renner, M. Gatica, M. Riquelme, B. Gatica, Characterization of the yeast mitochondrial conductive channel: a counterpart to the mammalian permeability transition pore?, *J. Bioenerg. Biomembr.* 30 (1998) 419–429.
- [5] P.D. Boyer, The ATP-cytosine-A spinodal molecular machine, *Annu. Rev. Biochem.* 56 (1987) 715–745.
- [6] J.P. Winkle, P.L. Pedersen, Phosphate transport processes in eukaryotic cells, *J. Membr. Biol.* 111 (1989) 199–213.
- [7] H. Wollrab, Molecular aspects of inorganic phosphate transport in mitochondria, *Biochim. Biophys. Acta* 811 (1984) 115–134.
- [8] E. Careful, Intracellular calcium homeostasis, *Annu. Rev. Biochem.* 56 (1987) 391–423.
- [9] F. Zaccarelli, D. Nicholls, The role of phosphate in the regulation of the independent calcium efflux pathway of liver mitochondria, *Eur. J. Biochem.* 127 (1982) 315–318.
- [10] D.G. Nicholls, M. Crampton, Mitochondrial calcium transport, *FEBS Lett.* 311 (1992) 261–268.
- [11] S. Uribe, F. Rengel, J.P. Fariñas, Interactions of calcium with yeast mitochondria, *Cell Calcium* 11 (1992) 211–217.
- [12] C. Berro, E. Chávez, J.S. Rodríguez, R. Moreno-Sánchez, The mitochondrial membrane permeability transition induced by inorganic phosphate and inorganic arsenite. A comparative study, *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* 117 (1997) 93–99.
- [13] H.F. Tin Wills, E.C. Slater, Uncoupling of respiratory chain phosphorylation by arsenate, *Biochim. Biophys. Acta* 343 (1987) 1–17.
- [14] D.M. Goodham, R.K. Prida, The coupling of oxidoreduction and dissipation with esterification of phosphate in muscle, *Biochem. J.* 31 (1975) 1817–1831.
- [15] R.K. Cross, F. Lipman, The effect of arsenate on aerobic phosphorylation, *J. Biol. Chem.* 201 (1953) 225–243.
- [16] S.A. Mason, M.C. Wisniewski, M.J. Gerner, Synthesis and hydrolysis of ADP-arsenate by beef heart submitochondrial particles, *J. Biol. Chem.* 258 (1983) 4206–4211.
- [17] R. Moreno-Sánchez, Contribution of the translocase of adenine nucleotides and the ATP synthase to the control of oxidative phosphorylation and uncoupling in liver mitochondria, *J. Biol. Chem.* 260 (1985) 12194–12198.
- [18] I. Lecht, I. Ben, S. Janda, Z. Hufvick, K. Jazovnik, Characterization of phosphate transport in *Saccharomyces cerevisiae*, *Biochem. Mol. Biol. Int.* 41 (1997) 431–437.
- [19] T. Seelha, S.Q. No, J. Li, J.A. Schiff, A sulfate metabolizing center in *Zygosphaera mitochondria*, *Biochem. J.* 253 (1989) 331–339.
- [20] S. Prieto, F. Bouldner, D. Riquelme, E. Rial, Activation by ATP of a proton-conducting pathway in yeast mitochondria, *Eur. J. Biochem.* 208 (1982) 487–491.
- [21] S. Prieto, F. Bouldner, E. Rial, The mechanism for the ATP-induced uncoupling of respiration in mitochondria of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, *Biochem. J.* 307 (1995) 617–621.
- [22] V. Gattoglio, C. Parré, E. Moreno, A. Peña, E. Uribe, Potassium collapses the transmembrane potential in yeast mitochondria while the rate of ATP synthesis is inhibited only partially: modulation by phosphatase, *Arch. Biochem. Biophys.* 346 (1997) 37–44.
- [23] D.W. Jung, F.C. Bouldner, D.R. Pfeiffer, Properties of a cytochrome-b-c<sub>1</sub> permeability transition pore in yeast mitochondria, *J. Biol. Chem.* 272 (1997) 21104–21112.
- [24] S.R. De Klotz, R.K.A. Van Wieringen, V.V. Koenigsberger, Studies of proton synthesis by protoplasts of *Saccharomyces cerevisiae*, *Biochim. Biophys. Acta* 67 (1981) 136–143.
- [25] A. Peña, M.E. Peña, E. Escamez, E. Peña, A novel method for the rapid preparation of coupled yeast mitochondria, *FEBS Lett.* 91 (1977) 209–213.
- [26] G.A. Orval, J.C. Bardwell, M.M. David, Determination of serum proteins by means of the biuret reaction, *J. Biol. Chem.* 177 (1949) 751–766.
- [27] K.E.O. Akerman, M.K.F. Wikström, Salivarin as a probe of the mitochondrial membrane potential, *FEBS Lett.* 68 (1976) 191–197.
- [28] I. Trautwein, W. Langenfeld, G. Schwesinger, UV method with bisulfite and glucose-6-phosphate dehydrogenase, in: Bergmeyer (Ed.), *Methods of Enzymatic Analysis*, vol. 7, Verlagsgesellschaft, 1995, pp. 346–357.
- [29] H. Klein, V. Magdalen, B. Schriber, G. Stroh, F. Lottspeich, W. Baudrow, Cytoplasmic and mitochondrial forms of yeast adenylate kinase 2 are N-acetylated, *Biochim. Biophys. Acta* 1280 (1996) 221–226.
- [30] C.H. Fiske, Y. Subbarow, The colorimetric determination of phosphorus, *J. Biol. Chem.* 66 (1925) 375–400.
- [31] A. Peña, J. Ramírez, Effect of nonconducting anions on deprotonation of phosphate transport in yeast, *Biochim. Biophys. Acta* 873 (1984) 179–183.
- [32] B. Gatica, O. Benoit, V. Riquelme, M. Riquelme, ATP-induced uncoupling channel in yeast mitochondria, *J. Biol. Chem.* 269 (1994) 25436–25443.
- [33] C. Bellarín, E. Soriano, An electrophysiological study of yeast mitochondria, *J. Biol. Chem.* 270 (1995) 19262–19268.
- [34] M. Otero, C. Nájera, Phosphate transport in yeast mitochondria: purification and characterization of a ribosomal protein dependent proteinoid showing a high affinity for phosphate, *Biochemistry* 17 (1978) 2118–2124.
- [35] J. Velasco, M. Riquelme, B. Gatica, Protection of yeast mi-

- mitochondrial structure by phosphate and other proton-coupling anions. *FEBS Lett.* 61 (1977) 18–22.
- [16] W.L. Klein, P.D. Boyer, Energetics of active transport by *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 247 (1972) 7215–7219.
- [17] R.E. Shel, H.A. Lardy, Stimulation of rat liver mitochondrial adenosine triphosphatase by anions. *J. Biol. Chem.* 239 (1974) 191–194.
- [18] R.H.A. Balesh, H.E. Van Wieringen, J.E. Van Wijk, I. Van Der Zant-De Graaf, R.E. Kooze, K. Kosh, J.A. Berden, R. Kraayenbol, The effect of sulfate on the ATP hydrolysis and synthesis activity of membrane bound proton-ATPase from various species. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 201 (1994) 407–412.
- [19] V. Fregni, S.A. Molinari, Interference of sulfate and phosphate on the activation of bacterial  $H_0$ -ATPase synthesis by  $JuI_0^+$ . in: F. Palmieri et al. (Eds.), *Progress in Cell Research*, vol. 3, Harwood Academic S.V., Amsterdam, 1995, pp. 39–44.
- [20] W.F. Borum, Transport of protons and of some weak acids and bases. *J. Membr. Biol.* 72 (1981) 1–14.



## **ANEXO 4**

## EL PAPEL DEL POTASIO DURANTE LA ISQUEMIA

Vicente Castrejón Téllez, Departamento de Bioquímica, Instituto de Fisiología Cerebral, UNAM, Apartado Postal 70-242, C. P. 04510, México, D.F., Tel: 56-22-56-32, Fax: 56-22-56-30. Correo electrónico: vcastrej@fisiol.unam.mx

### RESUMEN

Las mitocondrias de diferentes tejidos tienen canales específicos a  $K^+$  que son similares a los canales de  $K^+$  regulados por ATP ( $K_{ATP}$ ) de la membrana plasmática. Estos canales mitocondriales son sensibles a los bloqueadores y activadores de canales  $K_{ATP}$ . Los canales  $K_{ATP}$  parecen participar en el mecanismo de preconditionamiento a la isquemia. Los activadores de canales  $K_{ATP}$  protegen al miocardio durante el proceso de isquemia-reperfusión. La protección se evita con bloqueadores de canales  $K_{ATP}$ . La modulación de los canales  $K_{ATP}$  durante la isquemia puede prevenir la muerte celular y por lo tanto tiene un gran potencial terapéutico.

**PALABRAS CLAVE:** Mitocondria, canales  $K_{ATP}$ ,  $K^+$ , isquemia preconditionante, isquemia-reperfusión.

### ABSTRACT

Mitochondria from different tissues possess potassium channels similar to the ATP regulated potassium channels ( $K_{ATP}$ ) found in the plasma membrane. The mitochondrial channels are sensitive to blockers and activators of  $K_{ATP}$  channels. The  $K_{ATP}$  channels are thought to participate in the mechanism of preconditioning to ischemia. The  $K_{ATP}$  activators protect ischemic - reperfused myocardium. This protection is abolished by blockers of the  $K_{ATP}$  channels. Modulation of  $K_{ATP}$  channels during ischemia may prevent the cell death and has great therapeutic potential.

**KEY WORDS:** Mitochondria,  $K_{ATP}$  channels,  $K^+$ , preconditioning to ischemia, ischemia-reperfusion

### GENERALIDADES DE LA ISQUEMIA

La isquemia consiste en una disminución en el aporte de oxígeno como resultado de una reducción en la perfusión sanguínea. La limitada disponibilidad de oxígeno (hipóxia o anoxia) evoca respuestas celulares compensatorias. De no restablecerse la disponibilidad

de oxígeno, las células mueren. Sin embargo, una gran cantidad de estudios han demostrado que buena parte del daño celular asociado a la isquemia ocurre como resultado de la reperfundición y el súbito aumento en la disponibilidad de oxígeno.

En los humanos, el daño por isquemia en diversos células y tejidos es probablemente una de las principales causas de muerte. Las enfermedades cardiovasculares frecuentemente producen daño por isquemia e hipoxia en el corazón, el cerebro, el intestino, el riñón y el hígado. El conocimiento de las alteraciones que sufren las células durante la isquemia podría proveer información importante para el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas.

En los organismos aeróbicos bajo condiciones limitantes de oxígeno, la demanda de glucosa aumenta incrementando la glucólisis anaerobia, al mismo tiempo se incrementa la permeabilidad de la membrana plasmática y se eliminan los gradientes iónicos y eléctricos. Cuando un tejido sufre de insuficiencia de oxígeno, la fosforilación oxidativa mitocondrial es inhibida dando como resultado una caída en los niveles de ATP. Disminuyendo la mayoría de las funciones metabólicas celulares junto con la deficiencia en la producción de energía.

Para sobrevivir a la deficiencia de oxígeno, los organismos responden con cambios bioquímicos y fisiológicos como, la activación del flujo glucolítico y la estabilización de la permeabilidad membranial, probablemente mediante disminución de la actividad de los canales iónicos. La activación de la glucólisis provoca un decremento en los niveles de glucógeno y un aumento en los niveles de ácido láctico en el citosol, disminuyendo el pH intracelular (1).

### FISIOLOGÍA DE IONES EN LA ISQUEMIA Fisiopatología del $Ca^{2+}$

El  $Ca^{2+}$  es un catión que en altas concentraciones actúa como una toxina celular (2). Durante la anoxia la

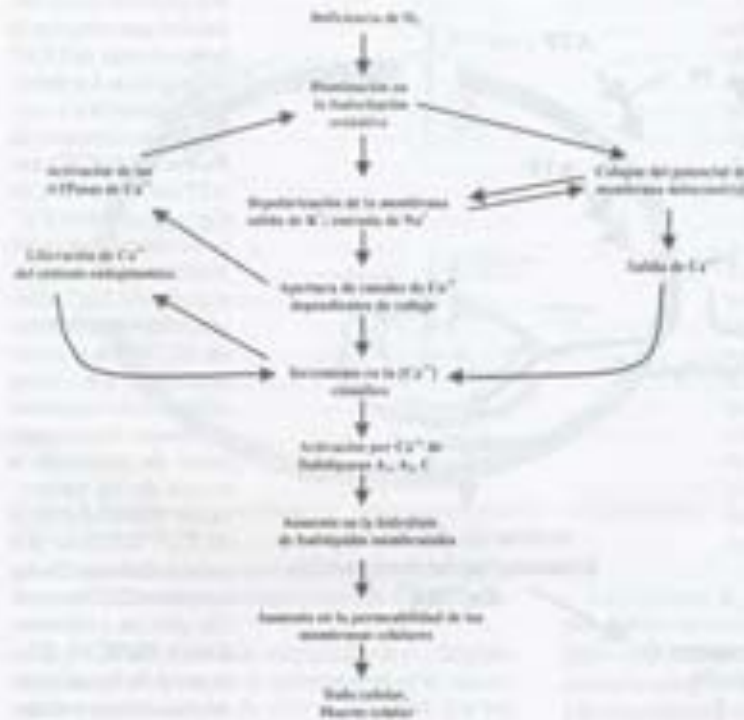


Figura 1. Principales eventos metabólicos que se presentan en células sensibles a la limitación de oxígeno. Desde las consecuencias energéticas durante la deficiencia de O<sub>2</sub>, hasta el hinchazón y muerte celular (1).

mitocondria aumenta de volumen y comienza a salir Ca<sup>2+</sup> de la matriz acumulándose en el citoplasma. La membrana plasmática de la célula hinchada se hace más permeable, porque el Ca<sup>2+</sup> activa fosfolipasas que digieren a los fosfolípidos de las membranas, permitiendo la salida de varias enzimas solubles, coenzimas y otros metabolitos hacia el espacio extracelular (3) (Fig 1).

El incremento en la concentración de Ca<sup>2+</sup> en el citosol induce las fosfolipasas A1, A2 y C cuya acción se ha considerado muy dañina bajo condiciones de anoxia. Un ejemplo en la participación de las fosfolipasas se observa en la actividad de la fosfolipasa C cuya función continua aún bajo condiciones limitantes de oxígeno lo que resulta en un decremento de los niveles de fosfatidil-inositol. La principal vía responsable de la síntesis y degradación del fosfatidil-inositol se ilustra en la figura 2. En respuesta a la movilización

de Ca<sup>2+</sup> intracelular se favorece la actividad de la fosfolipasa C sobre la degradación del fosfatidil-inositol-(4,5)-bisfosfato (PI(4,5)P<sub>2</sub>) liberando diacilglicerol e inositol trifosfato (IP<sub>3</sub>), que actúa como segundo mensajero y funciona como señal para la liberación de Ca<sup>2+</sup> de diversas pomas intracelulares (1) (Fig 2).

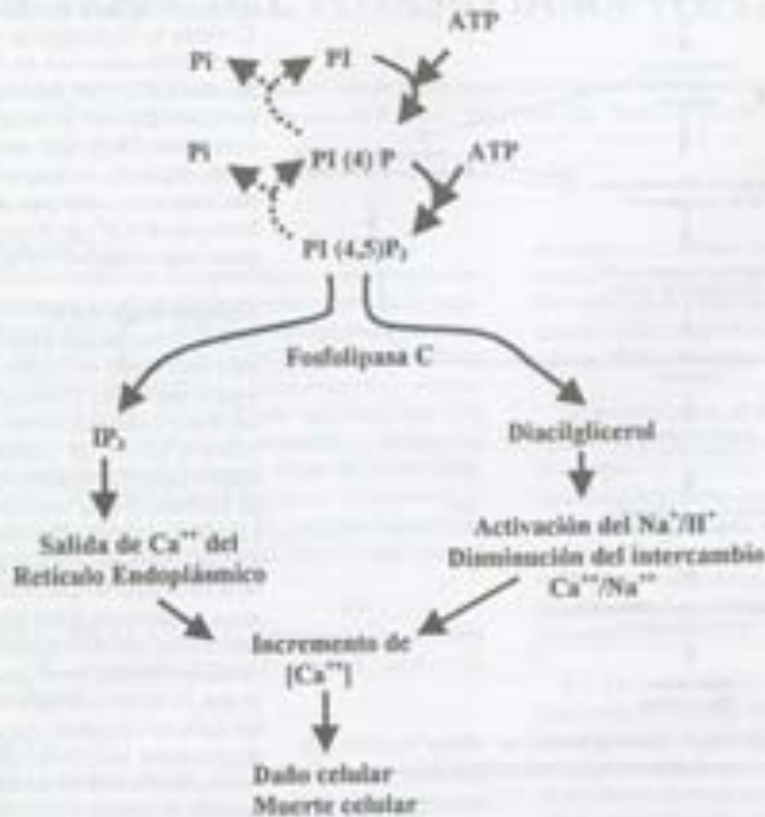
**Fisiopatología del K<sup>+</sup>**

El K<sup>+</sup> y el Na<sup>+</sup> juegan un papel muy importante en células de tejidos nerviosos y musculares, estos iones son transportados a través de canales iónicos específicos localizados en las membranas celulares. La distribución de estos iones a través de la membrana genera un equilibrio que resulta en un gradiente eléctrico. Existen células que son eléctricamente excitables y otras que no lo son, la diferencia entre estos tipos de células es que en las primeras, los canales presiones son sensibles a las diferencias de potencial eléctrico

entre la superficie externa e interna de la membrana (canales dependientes de voltaje).

Durante la anoxia las células comienzan a hincharse debido a que no pueden mantener las concentraciones iónicas normales en su interior. En células cardiacas este cambio de volumen es provocado principalmente por un intercambio masivo de K<sup>+</sup> por la entrada de Na<sup>+</sup> parcialmente compensada por la salida de K<sup>+</sup> citoplásmico. La depleción de K<sup>+</sup> modifica el potencial de membrana plasmática activando diversos tipos de canales de Ca<sup>2+</sup> dependientes de voltaje y desplazando la entrada masiva de Ca<sup>2+</sup> al citoplasma.

El K<sup>+</sup> no sólo afecta la célula a nivel de la membrana celular, también afecta en otros organelos, como la mitocondria. Por ejemplo, el flujo neto de K<sup>+</sup> a través de la membrana interna mitocondrial regula funciones importantes en la mitocondria, como son la fosforilación



**Figura 2.** En condiciones limitadas de O<sub>2</sub>, los niveles de fosfolípido inositol (PI) disminuyen mientras que los de diacilglicerol aumentan. Por ejemplo como se muestra para niños. En condiciones normales el PI es fosforilado dos veces en las posiciones 4 y 5 del anillo hasta formar PI(4,5)P<sub>2</sub>. El balance de PI(4,5)P<sub>2</sub> se mantiene al convertirse nuevamente a PI. Durante la isquemia, en respuesta a un incremento en la concentración de Ca<sup>2+</sup> (representado como Ca<sup>2+</sup>) se activa la fosfolipasa C, enzima que actúa sobre PI(4,5)P<sub>2</sub>, liberando diacilglicerol más un tercer inositol (IP<sub>3</sub>) como segundo mensajero que estimula la salida de Ca<sup>2+</sup> de poras intracelulares. Resultando en una cascada patológica de Ca<sup>2+</sup> que finaliza en el daño y muerte celular (1).

oxidativa y la homeostasis del Ca<sup>2+</sup> celular (4).

#### MECANISMOS DE TRANSPORTE DE Ca<sup>2+</sup> Y DE K<sup>+</sup>

##### El transporte de Ca<sup>2+</sup>

Las células de eucariotas presentan sistemas de transporte de Ca<sup>2+</sup> en la membrana plasmática, en la mitocondria y en el retículo endoplásmico. Esos sistemas de transporte poseen diferentes propieda-

des cinéticas y son utilizados para regular la homeostasis del Ca<sup>2+</sup> en la célula. La membrana plasmática contiene tres sistemas de transporte de Ca<sup>2+</sup>: una ATPasa específica de Ca<sup>2+</sup>, un canal de Ca<sup>2+</sup> y un intercambiador Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup>. La concentración de Ca<sup>2+</sup> citoplásmico es alrededor de 10<sup>-7</sup> M. En la mitocondria el Ca<sup>2+</sup> entra utilizando la energía del gradiente electroquímico de protones, a través de un uniprotador electroforético de Ca<sup>2+</sup> inhibido por rojo de nitrógeno (5). La salida de Ca<sup>2+</sup> se efectúa por un intercambiador Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup>, diferente al de la membrana plasmática y un intercambiador Ca<sup>2+</sup>/H<sup>+</sup> (Fig 3).

Se ha propuesto que la elevación de Ca<sup>2+</sup> en la matriz mitocondrial aumenta la fosforilación oxidativa, por medio de la activación de dehidrogenasas sensibles a Ca<sup>2+</sup> sin necesidad de bajar el cociente ATP/ADP y manteniendo la concentración de ATP citosólico (6). El efecto del Ca<sup>2+</sup> es modificado por el Mg<sup>2+</sup>, que inhibe competitivamente la entrada de Ca<sup>2+</sup>, así como por el Na<sup>+</sup>, que se intercambia por el Ca<sup>2+</sup> de la mitocondria.

##### El transporte de K<sup>+</sup>

Mucha de la energía de las células animales es utilizada para dirigir la entrada de K<sup>+</sup> y la salida de Na<sup>+</sup> a través de la membrana plasmática mediante la ATPasa de Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> de la membrana plasmática. A su vez, el K<sup>+</sup>

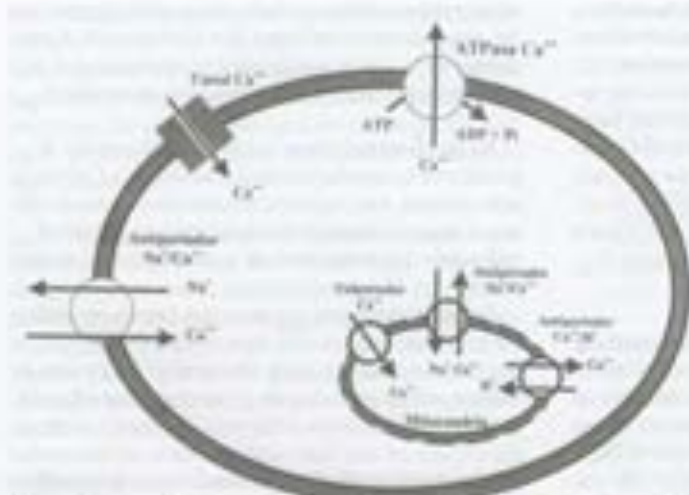


Figura 3. Sistemas de transporte de  $Ca^{2+}$  (representado como  $Ca^{++}$ ) en la membrana celular y en la mitocondria.

... puede salir de la célula a través de canales específicos a  $K^+$  localizados en la membrana plasmática (7) (Fig. 4).

El  $K^+$  es el catión más abundante en el citoplasma y la mitocondria; en la mitocondria, el  $K^+$  alcanza una concentración de 100 a 120 mM. En las mitocondrias se ha descrito un antiportador  $K^+/H^+$  que cataliza la salida del  $K^+$  hacia el citosol, y un antiportador que transporta  $K^+$  a la matriz mitocondrial (Fig. 4). Estos dos sistemas en conjunto con el movimiento paralelo de aniones, como el fosfato, son responsables de la regulación de la acumulación del  $K^+$  intramitocondrial (8).

**CANALES  $K_{ATP}$  Y SU FUNCIÓN DURANTE LA ISQUEMIA**

El interés en los canales de  $K_{ATP}$  mitocondriales está creciendo debido a su posible participación en el metabolismo energético mitocondrial y a su posible relación con estados patológicos asociados a una limitación en la disponibilidad de oxígeno como la isquemia y la anemia.

Los canales iónicos son proteínas intrínsecas de membrana que pueden abrirse o cerrarse como resultado de cambios en el potencial transmembranal (canales dependientes de voltaje), o por agentes específicos que interactúan con alguna proteína del canal (9).

En las células cardiacas existen mecanismos intrínsecos, que participan en la respuesta patofisiológica a la isquemia. Uno de los mecanismos que se presenta en respuesta a la isquemia es el incremento en la salida de  $K^+$  del miocito y en consecuencia una disminución en el potencial de acción; este efecto se debe a la activación de un canal de alta conductancia a  $K^+$  que se abre al disminuir los niveles de ATP (10).

Los canales  $K_{ATP}$  localizados en la membrana plasmática de diferentes tipos de células juegan un papel importante en varios eventos celulares, incluyendo la salida de insulina de las células  $\beta$  pancreáticas y la relajación del músculo liso (11). Sin embargo, drogas como las sulfonilureas que inhiben la actividad de los ca-

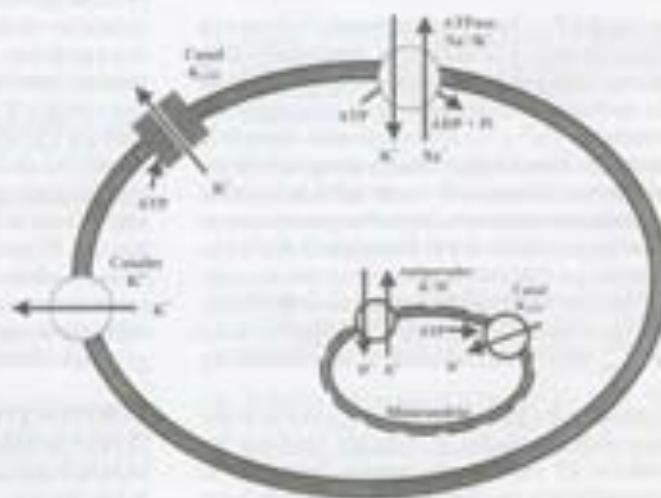


Figura 4. Sistemas de transporte de  $K^+$  en la membrana celular y en la mitocondria.

nales  $K_{ATP}$  se emplean en el tratamiento de la diabetes mellitus tipo II, así como también se emplean activadores de canales  $K_{ATP}$  en el tratamiento de la hipertensión (11). Se ha detectado un tipo similar de canales altamente selectivos para  $K^+$  y sensibles a ATP en la membrana interna mitocondrial. Los canales  $K_{ATP}$  pueden inhibirse no solo por adenosina nucleótidos y sus análogos sino también por una variedad de sulfonilureas proporcionando evidencia de que los canales  $K_{ATP}$  mitocondriales poseen sensibilidad farmacológica semejante a los canales  $K_{ATP}$  de la membrana plasmática (12).

La presencia de canales de  $K_{ATP}$  en la mitocondria se confirmó después del aislamiento de una fracción de membranas internas de mitocondrias de hígado de rata y de corazón de res; estas membranas se reconstituyeron en bicapas lipídicas planares y se observó que el flujo electroforético de  $K^+$  sensible a ATP fue activado por activadores de canales de  $K^+$  como la cromakalim e inhibido por bloqueadores de canales de  $K^+$  como el glibenclid.

Se cree que los canales de  $K^+$  son el factor principal para mantener la homeostasis mitocondrial de  $K^+$ , que a su vez controla la presión osmótica y el volumen mitocondrial. Estos cambios de volumen son considerados como uno de los mecanismos importantes del control metabólico a nivel mitocondrial, ya que modulan procesos como la síntesis de citralina, la carbonilación del piruvato y la oxidación de ácidos grasos.

Los canales  $K_{ATP}$  fueron originalmente descritos en sarcómera cardíaco y la apertura de estos canales  $K_{ATP}$  ha sido asociada con la disminución del potencial de acción cardíaco, el decremento de la concentración intracelular de  $Ca^{2+}$  y la cardioprotección durante la isquemia (13). Sin embargo, todavía no han sido determinadas las consecuencias de la activación de los canales  $K_{ATP}$  en la mitocondria, incluyendo a procesos como la fosforilación oxidativa y el transporte de  $Ca^{2+}$ . Los compuestos que funcionan como activadores de canales  $K_{ATP}$  pueden ser utilizados como excelentes herramientas para estudiar la fisiología y participación de los canales  $K_{ATP}$  en la célula incluyendo la mitocondria (14).

Holmuhamedov y colaboradores (15), reportaron que en mitocondrias aisladas de músculo cardíaco, los activadores de canales de potasio indujeron la depolarización de la membrana, la aceleración de la respiración, el retardo en la producción de ATP, el incremento en la liberación de  $Ca^{2+}$  e inducción del hincha-

miento mitocondrial asociado con la salida de proteínas del espacio intermembranal. Esos efectos son dependientes de la concentración de  $K^+$  extramitocondrial y pueden ser inhibidos por bloqueadores de canales  $K_{ATP}$ .

Se ha observado que la apertura de canales  $K_{ATP}$  promueve la regulación de los niveles de  $Ca^{2+}$  en la mitocondria, esta regulación sobre los niveles de calcio se observó al estimular la apertura de canales  $K_{ATP}$  utilizando diferentes tipos de activadores de canales.

Estudios recientes sugieren que breves episodios repetidos de isquemia y reperfusión le proporcionan al miocardio mayor resistencia en contra de subsiguientes periodos de isquemia o reperfusión. Este fenómeno conocido como isquemia precondicionante es una habilidad que tiene el miocardio para protegerse del daño producido por la isquemia (15). Se han realizado diversos estudios para tratar de entender el mecanismo de la isquemia precondicionante sin encontrar hasta la fecha una explicación a ese fenómeno, aún así se ha observado que durante el precondicionamiento se activan diversos receptores de membrana como son el receptor a adenosina y el receptor alfa adrenérgico. La activación de este tipo de receptores activan procesos de transducción que pueden activar proteínas cinasas C, estimular la forma inducible de la óxido nítrico sintasa o inducir la apertura de canales  $K_{ATP}$  (15). Se ha demostrado que en sistemas celulares que presentan receptores de adenosina tipo A<sub>1</sub>, acoplados a proteínas Gi (inhibitorias), la adición de teonina pertussis interfiere con la activación de canales de  $K_{ATP}$ . Los canales  $K_{ATP}$  son muy abundantes en el tejido cardíaco y se les ha atribuido un papel cardioprotector durante los episodios de isquemia abreviando la duración del potencial de acción ventricular, reduciendo de esta manera la entrada de calcio y atenuando la contracción. Rohmann y colaboradores (16), utilizando como modelo de estudio al corazón de cerdo demostraron que el efecto cardioprotector de los canales de potasio sobre el IPC fue prevenido por glibenclamida, un bloqueador del canal  $K_{ATP}$ .

#### PERSPECTIVAS DE TRATAMIENTO

El papel farmacológico para el canal mitocondrial  $K_{ATP}$  en la isquemia parece aclararse. Normalmente, durante este proceso, los niveles de ATP en miocitos disminuyen y el corazón no sobrevive a la reperfusión debido a una liberación masiva de  $Ca^{2+}$  por parte de la

mitocondria. Cualquier pretratamiento con compuestos que abren los canales de  $K^+$  o el precondicionamiento del tejido mediante un breve período de isquemia, protege al corazón durante la isquemia subsiguiente. De esta manera aunque existe pérdida de ATP, el corazón recobra su función durante la reperfusión (4).

La cardioprotección por cualquier compuesto que estimule la apertura del canal  $K_{ATP}$  o el precondicionamiento es inhibido por los bloqueadores de este tipo de canales  $K_{ATP}$ . Otros grupos de investigación proponen que la conductancia al  $K^+$  podría participar en la protección del músculo cardíaco por una posible regulación de los niveles de  $Ca^{2+}$  mitocondrial (15).

En algunos estudios recientes sobre el fenómeno de isquemia precondicionante proporcionan evidencia de la participación de los canales  $K_{ATP}$  durante la cardioprotección. Estos canales se activan cuando los niveles intracelulares de ATP caen durante la isquemia. Entender que es lo que sucede durante el mecanismo de precondicionamiento podrá aumentar la habilidad para desarrollar nuevas aplicaciones farmacológicas en contra del daño por isquemia y reperfusión.

El reconocimiento de los canales  $K_{ATP}$  mitocondriales como blanco de los activadores de canales de  $K^+$  agrega una nueva dimensión a la farmacología de estos compuestos.

**REFERENCIAS**

1. Hochstadt P W (1983) Defense Strategies Against Hypertension and Hypothermia. *Science* 221: 234-240.
2. Hansen A J (1985) Effects of anesthesia on ion distribution in the brain. *Physiol Rev* 65: 105-140.
3. Ferraz R, Pedersen F, Bongrazio M, Guà G, Bernocchi P, Di Lisa F, y Viola O (1993) Mitochondrial energy production and cation control in myocardial ischemia and reperfusion. *Basic Res Cardiol* 88: 405-412.
4. Holmlund-Jensen E L, Ivanovic S, Dzeja P P, Ivanovic A, y Terzic A (1996) Mitochondrial ATP-sensitive  $K^+$  Channels mediate cardiac mitochondrial function. *Am J Physiol (Heart Circ Physiol)* 271: H1567 - H1576.

5. Mason C L (1971) Specific inhibition of mitochondrial  $Ca^{2+}$  transport by ruthenium red. *Biochem Biophys Res Commun* 42: 298-305.
6. Dennis R M y McCrossan J G (1983) Physiological role of  $Ca^{2+}$  transport by mitochondria. *Nature* 311: 615.
7. Louissian A, Leroy C, y Castang M (1997) Potassium transport in opossum kidney cells: Effects of Na-selective and K-selective ionophore cryptands, and of valinomycin, FCCP and pyrazole. *Biochem Biophys Acta* 1331: 36-45.
8. Botley G P, Jakowski M S, Faruqi T, y Jung D W (1984)  $K^{+}$ /ATP transport in heart mitochondria. *J Biol Chem* 259:4872-4.
9. Degrois L, Madoni-Veteli S, y Quintanar-Jencic C (1990) The hydration structure of the  $Na^+$  and  $K^+$  ions and the selectivity of their ionic channels. *Biochem Biophys Acta* 1074: 149-156.
10. Smith J M y Walker G M (1996) ATP-sensitive potassium channels are altered in ventricular myocytes from diabetic rats. *Mol Cell Biochem* 158: 43-51.
11. Januszyn A, Pliński J y Olszewski M (1996) Effects of inhibitors and activators of ATP-regulated  $K^+$  channel on mitochondrial potassium transport. *Biochem Mol Biol Res* 25:477-484.
12. Adams G J H, y Avello R F M (1992) The sulfhydryl reagent in *Biochem Biophys Acta* 1175: 45-50.
13. Grover G J (1997) Pharmacology of ATP-sensitive potassium channel ( $K_{ATP}$ ) opens in models of myocardial ischemia and reperfusion. *Can J Physiol Pharmacol* 75: 306-315.
14. Garlid K D, Puczk F, Yarov-Yarovoy V, Sun X, Schneider P A (1996) The mitochondrial  $K_{ATP}$  channel as a receptor for potassium channel openers. *J Biol Chem* 271 (15): 8796 - 8799.
15. Okabe S, Xu L, Bernardo N L, Yoshida K y Kokorja B C (1999) Myocardial preconditioning: Basic concepts and potential mechanisms. *Mol Cell Biochem* 198:3 - 12.
16. Ebermann S, Weppner H, Schelling P, Kao Swei L, Vinkow P D, y Lues J (1994) Involvement of ATP-sensitive potassium channels in preconditioning protection. *Basic Res Cardiol* 89: 361 - 376.