

00581

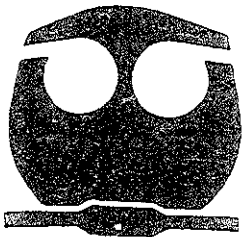
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO



FACULTAD DE QUIMICA  
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

“CARACTERISTICAS DE LA SALIDA DE POTASIO DE  
LA LEVADURA *Saccharomyces cerevisiae* INDUCIDA  
POR EL TRATAMIENTO CON COMPUESTOS  
CATIONICOS”

T E S I S  
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:  
DOCTOR EN CIENCIAS QUIMICAS  
( B I O Q U I M I C A )  
P R E S E N T A :  
M. EN C. JOSE EMANUEL ENRIQUEZ FREIRE



MEXICO, D. F.

2000



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.

LA PRESENTE TESIS SE DESARROLLO EN EL LABORATORIO 306-ORIENTE DEL DEPARTAMENTO DE GENETICA MOLECULAR DEL INSTITUTO DE FISIOLOGIA CELULAR, BAJO LA DIRECCION DEL INVESTIGADOR EMERITO DR. ANTONIO PEÑA DIAZ.

DURANTE EL PERIODO DE DESARROLLO DE LA TESIS, EL ALUMNO FUE BECARIO DEL CONSEJO NACIONAL DE CIENCIA Y TECNOLOGIA (CONACYT) Y DE LA DIRECCION GENERAL DE ASUNTOS DEL PERSONAL ACADEMICO (DGAPA) DE LA UNAM.

Mi agradecimiento para el Dr. Antonio Peña Díaz por su valiosa asesoría y su apoyo académico y personal constantes.

Agradezco también a mis compañeros presentes y pasados del grupo del Dr. Peña el compañerismo y amistad que me han brindado a lo largo de mi estancia en el laboratorio 306-Ote.

Dedico el presente trabajo a mis padres Esteban Enríquez y Soledad Freire, y a mis hermanos Esteban y Alma Leyla.

Con especial dedicatoria también para mis amigos de Matías Romero y a mis amigas Ruth López y Martha Calahorra.

## INDICE

I. RESUMEN.	1
II. SUMMARY.	2
III. INTRODUCCION.	3
1. General.	3
2. Las proteínas de transporte primario en la levadura.	4
2.1. Las H <sup>+</sup> -ATPasas.	4
2.2. Las Bombas de iones.	5
2.2.1. Transportadores ABC.	6
2.2.2. ATPasas tipo P.	6
3. Proteínas de transporte secundario en la levadura.	6
3.1. El Transporte de potasio en la levadura.	7
3.2. La salida de potasio de la levadura.	8
4. Salida de potasio inducida por moléculas catiónicas.	9
IV. HIPOTESIS	11
V. OBJETIVOS.	12
VI. MATERIALES Y METODOS.	13
1. Cepa y condiciones de cultivo.	13
2. Determinación de potasio externo.	13
3. Bombeo de protones.	14
4. Determinación del pH intracelular.	14
5. Estimación del potencial de membrana.	14
6. Transporte de rubidio.	15
7. Determinación de la carga de superficie.	15
8. Carga de las levaduras con <sup>86</sup> Rb <sup>+</sup> .	15
9. Determinación de la salida de <sup>86</sup> Rb <sup>+</sup> .	16
10. Determinación de la fijación de terbio.	16
VII. RESULTADOS.	18
1. Efectos de los distintos compuestos catiónicos sobre la salida de potasio de la levadura.	18
2. Posible permeabilización de la levadura por los compuestos catiónicos.	20
3. Liberación del calcio epicelular.	21
4. Determinación de la carga de superficie.	22
5. Efecto de los compuestos catiónicos sobre la salida de <sup>86</sup> Rb de la levadura.	23
6. Determinación del contenido de potasio.	25
7. Efecto de los compuestos catiónicos sobre el transporte de <sup>86</sup> Rb <sup>+</sup> .	27
8. Efecto del DEAE-D y la DHS sobre la salida de potasio; efecto del MgCl <sub>2</sub> .	27
9. Efecto del sorbitol sobre la salida de potasio.	28
10. Reversibilidad de los efectos con cloruro de magnesio.	31
11. Cambios en el pH interno de la levadura en presencia de los compuestos catiónicos.	32
12. Efecto de los compuestos catiónicos sobre el bombeo de protones.	34
13. Efecto de los compuestos catiónicos en presencia de otras fuentes de carbono.	34

## ABREVIATURAS

PMA1	gene de la H <sup>+</sup> -ATPasa de membrana plasmática, principal regulador del pH citosólico.
LEU1	gene de la isoprilmalato isomerasa, biosíntesis de leucina.
PMA2	gene de la ATPasa de membrana plasmática no esencial para la viabilidad celular.
KHA1	gene del intercambiador K <sup>+</sup> /H <sup>+</sup> de membrana plasmática.
NHA1	gene del intercambiador Na <sup>+</sup> /H <sup>+</sup> de membrana plasmática.
ABC	familia génica de transportadores que unen ATP.
STE6	gene de un transportador ABC, glicoproteína componente de la ruta secretoria del factor a.
SNQ2	gene de un transportador ABC relacionado con la resistencia pleiotrópica a drogas.
PDR5	gene de un transportador relacionado con la resistencia pleiotrópica a drogas.
PMR2/ENA1	gene de una ATPasa tipo P de sodio, localizada en la membrana plasmática.
ENA2	gene de una bomba de Na <sup>+</sup> de membrana plasmática, P-ATPasa.
ENA3	gene que se requiere para el funcionamiento de ENA1.
ENA4	gene que se requiere para el funcionamiento de ENA1.
TRK1	gene del uniportador de K <sup>+</sup> de alta afinidad.
TRK2	gene del uniportador de K <sup>+</sup> de baja afinidad.
GAL2	gene de la permeasa de galactosa.
HXT1	gene del transportador de glucosa de alta afinidad.
HXT2	gene del transportador de glucosa de baja afinidad.
TOK1	gene del canal rectificador saliente de potasio.
DUK1	otra denominación de TOK1.
YORK	otra denominación de TOK1.
YKC1	otra denominación de TOK1.
NAP1	gene del intercambiador K <sup>+</sup> /H <sup>+</sup> de <i>Enterococcus hirae</i> .
KEFC	gene del intercambiador K <sup>+</sup> /H <sup>+</sup> de <i>Escherichia coli</i> .
MID1	gene de un canal entrante de Ca <sup>2+</sup> y que se requiere para la cruza celular.
FPS1	gene de un canal involucrado en la salida de glicerol.
HOG	familia génica involucrada en la ruta de crecimiento en alta osmolaridad.
MID2	gene requerido para la cruza celular.
SLG1	gene que se requiere para mantener la integridad de la pared celular.
HAL4	gene involucrado en la homeostasis iónica.
HAL5	gene que codifica para un homólogo de una proteína cinasa confiere resistencia a sales.
SNF3	gene involucrado en la vía de detección de glucosa.
RGT2	gene de la glucosa permeasa.
DHS	Dihidroestreptomina

## I. RESUMEN

En este trabajo se caracterizó la salida de potasio de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* inducida por los siguientes agentes catiónicos : bromuro de Etidio (EB), dihidroestreptomomicina (DHS), cloruro de terbio ( $TbCl_3$ ) y DEAE-dextrán (DEAE-D).

La salida de  $K^+$  promovida por estos agentes catiónicos requiere de un sustrato oxidable; es decir, el fenómeno no se observa en ausencia de un sustrato metabolizable como glucosa o etanol. Los análogos no metabolizables de la glucosa (2-desoxiglucosa o 6-desoxiglucosa), o bien, los azúcares no metabolizables bajo las condiciones de los experimentos, no promueven la salida de potasio mas allá del control en ausencia de sustrato.

Otra generalización respecto al efecto de estos agentes catiónicos es que requieren unirse a sitios con carga negativa en la superficie celular para promover la salida de potasio. Es decir, el efecto disminuye con la disminución de las cargas negativas de la superficie de la levadura. El aumento de la carga de superficie inducido por el tratamiento con EDTA, sin embargo, no indujo de manera general un aumento mayor de la salida de potasio. Esto probablemente se deba a las diferencias en afinidades de los agentes catiónicos por la carga de superficie.

Se exploró la posibilidad de que los agentes catiónicos utilizados promovieran la ruptura celular en poblaciones de células sensibles al tratamiento con estos agentes. Algunos de los resultados que esgrimimos en el sentido contrario de esta alternativa son principalmente la dependencia de sustrato para la salida de potasio, la reversibilidad del fenómeno después de lavar con cloruro de magnesio las células previamente tratadas y la incapacidad de los agentes, excepto el EB, para promover la salida de  $^{86}Rb^+$  en células previamente cargadas. En general, la reversibilidad del tratamiento con los agentes catiónicos indica que el fenómeno requiere la integridad de la membrana.

En particular, el DEAE-D mostró una dependencia de la concentración interna de potasio para promover la salida de potasio de la levadura. Este mismo agente catiónico mostró que la salida de potasio que promueve, depende de la presión osmótica y pudiera estar activando alguna actividad de transporte sensible a la presión osmótica o mecanosensible.

Por otra parte, el cloruro de terbio parece estar activando un sistema intercambiador que permite la salida de potasio en intercambio por protones.

Los agentes catiónicos empleados no mostraron efectos sobre el potencial de membrana y, en consecuencia, sobre ningún sistema sensible a cambios en el potencial de membrana

## II. SUMMARY.

The effects of four structurally unrelated cationic agents: ethidium bromide (EB), DEAE-Dextran (DEAE-D), dihydrostreptomycin (DHS) and terbium chloride ( $TbCl_3$ ) were characterized for their ability to promote potassium efflux from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*.

As a common rule, this cationic agents promote potassium efflux in a substrate-dependent manner, that is, no effect could be detected when glucose or ethanol was absent from the incubation medium. Also non metabolizable glucose derivatives like 2-deoxyglucose or 6-deoxyglucose, or any non assimilable carbohydrate, in our experimental conditions, could support the efflux of potassium in the presence of the cationic agents to a level higher than the control in the absence of substrate.

A second generalization regarding the effect of the cationic agents tested upon the potassium efflux is the requisite of binding of the agents to discrete negative charges on the surface of the cell for the phenomenon to occur. That is, the induced efflux of potassium diminished when the negative surface charge diminished. On the contrary, not every increase due to EDTA treatment promoted an increase in the efflux of potassium. This could be ascribed to differences in affinities of the cationic agents for the negative surface charges.

The possibility that, as a result of the treatment with the cationic agents, the cells were permeabilized was explored. Arguments contrary to this statement are : the dependency of the phenomenon on the presence of a substrate, the reversion of the phenomenon after washing the cells with magnesium chloride and the inability of the agents, except EB, to promote  $^{86}Rb^+$  efflux from cells preloaded with this cation. Except for EB, the reversibility of the potassium efflux as a result of the washing of the cells with magnesium chloride indicated that the efflux of potassium induced by the cationic agents was a membrane phenomenon and required its integrity.

Regarding the effects of DEAE-D, it showed to depend on the internal potassium content and also on the osmotic pressure. DEAE-D effects point out to the activation of a mechanosensitive activity or to some transport activity activated by changes in osmotic pressure.

Terbium chloride appeared to activate an exchange of internally contained potassium and externally located protons, like a  $K^+/H^+$  exchanger proposed by Peña and Ramírez (B. B. Acta, 1068:237-244,1991).

In general, the cationic agents tested do not cause any appreciable changes in the membrane potential and, as a consequence, in any transport system dependent on it.



### III. INTRODUCCION

#### III.1. General.

El potasio juega un papel central en la vida; todos los organismos lo requieren; es por ello que la homeostasis del potasio ha sido objeto de extensos estudios para caracterizar su transporte tanto en células animales (Levitt, 1980) como en bacterias y microorganismos (Epstein y Laimins, 1980) donde se han descrito muchas de sus características.

En cuanto a los hongos, es *Saccharomyces cerevisiae* el organismo del cual se tiene más información sobre el transporte de potasio (Borst-Pauwels, 1981), aunque todavía no se ha llegado a un esquema cabal de los mecanismos de transporte, sus interacciones y regulación (Ramos et al., 1994; Gaber, 1992; André, 1995).

Como consecuencia de la actividad del transporte de potasio, el crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae* es independiente de la concentración externa de potasio hasta valores muy bajos del orden de 2 a 4  $\mu\text{M}$  (Ramos et al., 1985; Rodríguez-Navarro y Ramos, 1984). Con estas concentraciones de potasio externo las velocidades de crecimiento y el contenido interno de potasio (del orden de 130 a 150 mM) son constantes lo que implica que el sistema de captación de potasio se tiene que adaptar para proporcionar una entrada neta casi constante de potasio (Ramos et al., 1994).

Para mantener una cierta concentración interna de potasio, que no disminuye más allá de 80 a 100 mM aún a tiempos prolongados de ayuno (J. Ramírez, comunicación personal), la contraparte de los sistemas de captación de potasio son sus sistemas de salida, de los cuales se conoce menos respecto a su regulación y dependencia de la concentración interna, pH interno y/o potencial de membrana (André, 1995).

Los sistemas que permiten la salida de potasio consisten en un canal específico de potasio que funciona como un rectificador saliente (Ketchum et al., 1995; Reid et al., 1996; Lesage et al., 1996; Zhou et al., 1995), previamente caracterizado electrofisiológicamente (Bertl y Slayman, 1992), un canal mecanosensible caracterizado de la misma manera (Gustin et al., 1988) y de cuya existencia no se tiene una evidencia molecular, así como un presunto antiportador  $\text{K}^+/\text{H}^+$  del que se tiene evidencia fisiológica y molecular (Camarasa et al., 1996; Peña y Ramírez, 1991; Ramírez et al., 1996). Varios genes podrían ser candidatos para este antiportador y entre estos están: KHA1 (Ramírez et al., 1998) y NHA1 (Bañuelos et al., 1998).

Respecto al requerimiento de energía, tanto el transporte de potasio como la salida están acoplados a las fuentes de energía; es decir, el transporte está acoplado indirectamente a la  $\text{H}^+$ -ATPasa (Peña, 1982; Peña, 1976; Peña, 1975) y la salida de potasio a través del canal de potasio rectificador saliente está acoplada a cambios en el potencial eléctrico de la levadura (Bertl y Slayman, 1992; Ketchum et al., 1995; Reid et al., 1996) y dependen de la presencia de un sustrato como glucosa o etanol (Peña y Ramírez, 1991).

Adicionalmente, la homeostasis del potasio en la levadura tiene repercusión en el pH interno de la célula (Calahorra et al., 1998) y por contraparte una regulación inadecuada del pH celular tiene influencia sobre la concentración celular de potasio (Ramírez et al., 1998) y la continuación del ciclo celular (McCusker et al., 1987; Ramírez et al., 1998).

Con el advenimiento de la secuenciación total del genoma de levadura y el análisis de las secuencias génicas, se han deducido más de 100 posibles proteínas con función de transportador (André,1995). Esto último hace necesaria la búsqueda de compuestos que permitan discriminar y caracterizar estas actividades. En cuanto al estudio de los sistemas de salida de potasio, éste se ha abordado con el uso de compuestos catiónicos que promueven la salida de potasio de la levadura, de manera dependiente de energía (Borst-Pauwels,1981; Peña y Ramírez,1991; Peña et al.,1979).

### III.2. Proteínas de transporte primario en la levadura.

El transporte primario se define como aquel transporte en el cual distintos tipos de energía se transforman en energía electroquímica en la forma de gradientes de iones o solutos; es decir, a todas aquellas formas de transporte manejadas por el ATP, poder reductor o la luz, entre otras. En este apartado sólo consideraremos al transporte primario asociado con la membrana plasmática. Aunque la  $H^+$ -ATPasa de la membrana plasmática de la levadura es una ATPasa del tipo P, se le considera en forma especial dada su importancia en la generación de los gradientes de iones y solutos y en el control del pH en la levadura.

#### III.2.1. $H^+$ -ATPasas

A partir de los estudios en los cambios de concentración de los nucleótidos de adenina inducidos por el transporte de potasio al interior de la levadura, así como en el aumento del poder reductor (NADH), como consecuencia del mismo transporte, se pudo demostrar que existía en la levadura una ATPasa de protones (Peña et al., 1972; Peña,1982; Peña,1976). Dicha enzima al hidrolizar ATP y bombear protones al exterior genera un gradiente de potencial electroquímico de protones que es la fuerza necesaria para impulsar el transporte de otros iones o metabolitos al interior (Peña,1976; Goffeau y Slayman,1981).

La  $H^+$ -ATPasa es la principal bomba electrogénica de iones en los hongos y puede producir una diferencia de cuatro órdenes de magnitud entre las concentraciones externa e interna de protones (Gaber,1992). Además de proporcionar la energía para el transporte de nutrientes, también es el principal control del pH intracelular (Ulazewski et al,1987). Esta enzima es una proteína muy abundante que constituye del 20 al 40% de la proteína total de la membrana plasmática y constituye más del 90% del total de la actividad de ATPasa de la membrana plasmática (Gaber,1992).

La ATPasa de la membrana plasmática forma un intermediario covalente acil-fosfato como parte de su ciclo de reacción y tiene dos formas intermediarias fosforiladas ( $E_1$  y  $E_2$ ), las cuales difieren en conformación (Goffeau y Slayman,1981). Este tipo de enzima es denominada ATPasa  $E_1$ - $E_2$  o tipo P, debido a que alterna entre las conformaciones  $E_1$  y  $E_2$  y lleva a cabo una autofosforilación durante el transporte de iones (Gaber,1992).

Anterior al cambio de conformación de  $E_1$  a  $E_2$ , la enzima une un protón y una molécula de ATP, y por un mecanismo desconocido, la energía química contenida en el enlace del ATP se transforma en energía mecánica para transportar a través de la membrana al protón previamente unido (Gaber,1992).

El aislamiento del gene que codifica para la  $H^+$ -ATPasa de levadura se logró por la detección con anticuerpos de los productos de las genotecas de expresión  $\lambda$ gt11 y permitió la clonación del gene PMA1 de *Saccharomyces cerevisiae* (Serrano et al.,1986).

Este mismo gene de *Saccharomyces cerevisiae* se aisló posteriormente por complementación de la mutación recesiva que causa resistencia al inhibidor el Dio-9 (Ulazewski et al.,1987). PMA1 está localizado en el cromosoma VII, entre el centrómero y el gene LEU1 con el cual está fuertemente enlazado (Serrano et al.,1986).

El aislamiento del gene PMA1 ha permitido saber que la enzima, en su porción embebida en la membrana presenta de 8 a 12 cruces transmembranales, con los extremos amino y carboxilo terminales localizados en el citoplasma (van der Rest et al.,1995). También se han detectado los motivos, en la secuencia de aminoácidos, que están altamente conservados y se ha establecido la importancia de los mismos en el funcionamiento de la ATPasa. El residuo de glutamato 232 en el motivo TGES se requiere para la hidrólisis del intermediario fosforilado de la enzima; la treonina en el mismo motivo está involucrada en la unión del vanadato (van der Rest et al.,1995). El aspártico 378 en el motivo CSDKTGT se requiere para la formación del intermediario catalítico fosforilado y es esencial en el bombeo de protones (van der Rest et al.,1995). La lisina 475 en el motivo KGAP y el aspártico 534 en el motivo DPPR también se requieren para la formación del intermediario acil-fosfato (van der Rest et al.,1995).

Respecto a la regulación de la actividad de la ATPasa se sabe que lleva a cabo cambios drásticos en la actividad dependiendo principalmente de dos factores: la glucosa y el pH ácido. El metabolismo de la glucosa aumenta de manera reversible la  $V_{max}$  por un factor de 3 y disminuye la  $K_m$  de un valor de 1.5-2 mM a 0.3-0.6 mM, aumentando el pH de máxima actividad de 5.6 a 6.7 (Serrano,1983). En relación al pH, la actividad aumenta a pH más ácido y se puede inferir que el efecto combinado del pH y la glucosa definen la homeostasis del pH, dado que el metabolismo de la glucosa causa acidificación intracelular (Serrano,1991).

En *Saccharomyces cerevisiae* se ha descrito un segundo gene de ATPasa, el PMA2, el cual presenta un 90% de identidad en sus aminoácidos con PMA1; dicho gene probablemente corresponda a otra isoforma de la ATPasa y su expresión es irrelevante para el crecimiento de la levadura, ya que no se expresa en condiciones normales de crecimiento (Serrano,1991).

### III.2.2. Bombas de Iones.

Como resultado de la secuenciación del genoma de la levadura se tiene conocimiento de que al menos 30 genes diferentes tienen homología de secuencia con genes que codifican para actividades de bombas de iones (André,1995). En este apartado sólo se consideran aquellos genes que se sabe están asociados con actividades localizadas en la membrana plasmática.

### III.2.2.1. Transportadores ABC.

La secuenciación del genoma de la levadura permitió identificar por estudios de comparación de secuencias al menos 18 genes diferentes homólogos a la familia ABC (o cassette de unión del ATP). Estos genes pertenecen a dos grupos: los que tienen una copia de las unidades estructurales  $TM_6$ -NBF o NBF- $TM_6$  o los que tienen dos copias de estas mismas unidades estructurales (André,1995). Se sabe que los miembros de esta familia de transportadores están altamente conservados entre las especies, desde los microorganismos hasta el hombre (Balzi y Goffeau,1994) y están relacionados con la salida de ATP la que activa canales de  $Cl^-$  en las células. En *Saccharomyces* no se ha identificado todavía la localización de los productos de tales genes, aunque se ha podido caracterizar la salida de ATP de la levadura dependiente de glucosa, no se ha podido atribuir a productos génicos de la familia ABC. El miembro mejor caracterizado de la familia ABC en levadura es la proteína Ste6p, localizada en la membrana plasmática y que promueve la secreción de la feromona  $\alpha$  (André,1995). Otros genes caracterizados en la levadura son SNQ2 y PDR5 que confieren resistencia inespecífica a drogas (Balzi y Goffeau,1994).

### III.2.2.2. ATPasas tipo P.

Entre las ATPasas tipo P que han sido asociadas con la membrana plasmática están los productos de los genes PMR2/ENA1, ENA2, ENA3 y ENA4 (André,1995). El gene PMR2/ ENA1 es parte de un agregado de 4 genes contiguos ENA1,ENA2,ENA3 y ENA4, los cuales están en el cromosoma IV (André,1995; Haro et al.,1991). El gene PMR2/ENA1 se clonó por su capacidad para complementar la sensibilidad al  $Li^+$  de una cepa con baja capacidad para expulsar a este catión. La interrupción del gene generó una cepa defectuosa en la salida de  $Na^+$ ,  $Li^+$  y probablemente  $K^+$  y sensible al pH alcalino (Haro et al.,1991).

### III.3. Proteínas de transporte secundario en la levadura.

En el transporte secundario la energía para la traslocación de un soluto está dada por los gradientes eléctricos o químicos de otros solutos o iones. Estos gradientes electroquímicos se generan por los sistemas de transporte primario dependientes de ATP (van der Rest et al,1995). A los transportadores secundarios se les puede clasificar como uniportadores, simportadores, antiportadores y canales dependientes de potencial eléctrico. En este apartado se les considera en dos grupos dependiendo de la direccionalidad del transporte de iones.

### III.3.1. El transporte de potasio en la levadura.

Aquí sólo consideraremos el transporte de potasio como un ejemplo de transporte secundario.

La salida de protones por la ATPasa requiere la entrada de un contraión con el fin de lograr la electroneutralidad. Esto se logra por la operación de un sistema uniportador que transporta el potasio al interior (Conway y Duggan, 1958). Dicho uniportador tiene una mayor capacidad de discriminación por el potasio sobre el rubidio, sodio y magnesio para los cuales tiene las afinidades relativas de 2, 4 y 3 respectivamente (Conway y Duggan, 1958). El transporte de potasio está acoplado sólo indirectamente al funcionamiento de una  $H^+$ -ATPasa y se lleva a cabo con una estequiometría de  $1H^+ : 1K^+$ .

En medios carentes de amonio y sodio, fue posible expresar dos sistemas para el transporte de potasio en *Saccharomyces cerevisiae*, con diferente sensibilidad a CCCP (carbonil metacloro cianuro fenil hidrazona) y a la disminución de ATP. Estos transportadores mostraron ser de alta afinidad ( $K_m$  24  $\mu M$ ) y baja afinidad (2 mM) (Rodríguez-Navarro y Ramos, 1984). Adicionalmente se obtuvo un mutante que carecía del componente de alta afinidad (*trk1*) lo que le impedía crecer en medio con bajo nivel de potasio (Ramos et al., 1985). La eliminación del gene *TRK1* permitió concluir que este gene codifica para un transportador de alta afinidad y que la diferente afinidad por el potasio no se debía a diferentes especies de un mismo transportador, sino que reflejaban la existencia de dos transportadores (Gaber, 1992). Con la obtención de cepas *trk1* $\Delta$ , fue posible identificar genéticamente al gene del transportador de baja afinidad o *TRK2* (Ko y Gaber, 1991).

La eliminación de los genes *TRK1* y *TRK2* permitió la identificación de dos genes que complementan el defecto del transporte de potasio en la doble mutante *trk1* $\Delta$  *trk2* $\Delta$ . El análisis de secuencia de estos genes reveló que son altamente homólogos con los transportadores de galactosa y glucosa codificados por *GAL2* y *HXT1-2*, por lo que se postuló que son transportadores de azúcares dependientes de potasio (van der Rest et al., 1995).

Los estudios cinéticos del transporte de potasio en la levadura han demostrado que la entrada de potasio se lleva a cabo por medio de un sistema de traslocación multisitio. Este sistema tiene tres sitios para el potasio que son: el sitio del sustrato, el sitio modificador (Armstrong y Rothstein, 1967; Borst-Pauwels, 1981) y el sitio de activación (Borst-Pauwels et al., 1971). La unión y/o desplazamiento de los cationes de estos sitios da como resultado desviaciones de la cinética de Michaelis-Menten (Borst-Pauwels, 1981). En cualquier caso, la cinética de transporte de cationes monovalentes se afecta por el potencial de superficie (Borst-Pauwels, 1981). Los cationes polivalentes aumentan la constante de disociación del  $Rb^+$  para el sitio del sustrato y para el sitio de activación, porque los cationes polivalentes disminuyen el potencial de superficie negativo haciendo un efecto de apantallamiento de los grupos con cargas negativas (Borst-Pauwels, 1981).

### III.3.2. Salida de potasio de la levadura.

La salida de potasio de la levadura es un fenómeno dependiente de energía que se presenta de manera independiente a la entrada de potasio a la célula, porque funciona normalmente en células carentes del sistema de captación de potasio de alta afinidad o TRK1 (Peña y Ramírez, 1991). Es decir, la entrada y la salida de potasio no dependen del mismo transportador.

De las proteínas involucradas en la salida de potasio, sólo se tiene evidencia molecular de un canal rectificador saliente específico para potasio. Este canal ya se había detectado por los registros realizados con la técnica de fijación de voltaje o patch-clamp (Bertl y Slayman, 1992; Gustin et al., 1986). Con esta técnica se demostró que las corrientes específicas de potasio de 20 pS registradas en células enteras y en segmentos membranales *outside-out*, se inducían en respuesta a la despolarización de la membrana y se bloqueaban por inhibidores de canales de potasio como tetraetilamonio y cloruro de bario (Gustin et al., 1986).

Este canal sensible al potencial se expresó en ovocitos de *Xenopus laevis* y mostró ser un rectificador saliente (Ketchum et al., 1995; Reid et al., 1996; Lesage et al., 1996). El gene que codifica para este canal ha sido denominado TOK1 (Ketchum et al., 1995), DUK1 (Reid et al., 1996), YORK (Lesage et al., 1996) o YKC1 (Zhou et al., 1995). La eliminación de este gene no interfiere con el crecimiento mitótico, por lo que se propone que otro gene pudiera compensar la falta de DUK1 (Reid et al., 1996). Las propiedades farmacológicas y de regulación de YORK indican que las corrientes se bloquean con bario y quinina desde dos sitios con afinidades diferentes y el bloqueo con tetraetilamonio sólo se realiza desde un sitio (Lesage et al., 1996). Adicionalmente, este canal presenta duplicación del dominio de poro (Ketchum et al., 1995; Reid et al., 1996; Lesage et al., 1996) y su eliminación no afecta la conductancia de 40 pS también presente en la membrana (Zhou et al., 1995).

Además del canal descrito anteriormente, existe otro en la membrana plasmática que conduce tanto cationes como aniones de manera sensible al estiramiento de la membrana. Esta actividad mecanosensible se inhibe por gadolinio y es insensible al tetraetilamonio (Gustin et al., 1988). Uno de los papeles fisiológicos atribuidos a este canal es la regulación osmótica lo que se logra por el aumento de la conductancia a sales (Gustin et al., 1988). La eliminación del canal dependiente de potencial (Tok1p) indica que ambos canales están codificados por genes diferentes (Zhou et al., 1995).

Otras proteínas involucradas en la salida de potasio de la levadura pudieran ser las codificadas por los genes KHA1 (Ramírez et al., 1998) y NHA1 (Bañuelos et al., 1998), las cuales tienen función de intercambiadores. En el primer caso la evidencia fisiológica indica que se trata de un intercambiador  $K^+/H^+$ , ya que la mutante *kha1* acumula más potasio y presenta un pH interno más alto que la contraparte silvestre y se le ha atribuido un papel fisiológico en la regulación del pH en condiciones de alta concentración interna de potasio (Ramírez et al., 1998). El gene KHA1 presenta similitud de secuencia del orden

de 24% con NAP1, un intercambiador  $K^+/H^+$  de *Enterococcus hirae* y una menor similitud con KEFC de *Escherichia coli* (Ramírez et al., 1998). Por su parte NHA1 se ha reportado como un intercambiador  $Na^+/H^+$  con menor selectividad por el potasio que por el sodio (Bañuelos et al., 1998).

#### III.4. Salida de potasio inducida por moléculas catiónicas.

Los colorantes catiónicos han sido objeto de estudio por sus interacciones con moléculas y estructuras celulares (Peña et al., 1979). En la levadura se ha propuesto que para que los colorantes catiónicos interactúen con los componentes celulares, primero tienen que hacer contacto con la superficie celular y probablemente requieran introducirse a la célula (Armstrong, 1958), aunque también se ha reportado que cambios en el potencial de superficie tienen influencia sobre las actividades enzimáticas de transporte, dependiendo de la carga del ion a transportar, de los mecanismos de transporte y de la magnitud del potencial de superficie (Borst-Pauwels, 1981; Borst-Pauwels y Theuvenet, 1984; Roomans y Borst-Pauwels, 1978; Roomans y Borst-Pauwels, 1979).

A este respecto, se ha reportado que el bromuro de etidio se introduce a la levadura por el transportador de potasio (Peña et al., 1980), de una manera dependiente de energía; donde se concentra más de 100 veces (Peña y Ramírez, 1975). El hecho de que el bromuro de etidio interactúe con el transportador de potasio se dedujo de la cinética de inhibición competitiva que este colorante presenta por el potasio para la entrada (Peña y Ramírez, 1975). Adicionalmente, se sabe que en *Kluyveromyces lactis* la resistencia de esta levadura al bromuro de etidio correlaciona con el defecto de la misma cepa para internar al potasio (Brunner et al., 1982).

Se ha reportado que otros colorantes catiónicos también interfieren con el transportador de potasio, ya que presentan competencia para el transporte de  $^{86}Rb^+$  entre ellos: azul de metileno, safranina y acriflavina (Peña et al., 1979). Sin embargo, la salida de potasio de la levadura no se explica por la interferencia de las moléculas catiónicas con el transportador de potasio, ya que se presenta en mutantes *trk1* (Peña y Ramírez, 1991).

De manera general, las moléculas catiónicas disminuyen su efecto de promover la salida de potasio cuando en el medio hay  $Ca^{2+}$  o cationes monovalentes, presentando diferencias en el grado de inhibición, que derivan de las afinidades con las que se unen los compuestos catiónicos a los sitios con carga negativa de la superficie (Peña y Ramírez, 1975; Peña et al., 1979; Eilam, 1983).

En algunos casos se ha observado que la salida de potasio promovida por compuestos catiónicos induce una entrada de  $Ca^{2+}$  (Eilam, 1983), aparentemente porque la salida de potasio es de tipo electrogénico y esta energía se utiliza para el transporte de glicina y los cationes divalentes,  $Ca^{2+}$  y  $Mn^{2+}$  (Peña, 1978).

Otros ejemplos de compuestos catiónicos que promueven la salida de potasio de la levadura son algunos inhibidores de la ATPasa como: Dio-9 (Borst-Pauwels et al., 1983; Dufour et al., 1980; Foury et al., 1977), miconazol (Borst-Pauwels et al., 1983; Dufour et al., 1980), suloctidil (Borst-Pauwels et al., 1983), dicitlohexil carbodiimida (Borst-Pauwels et al., 1983; Dufour et al., 1980), dietilstilbestrol (Borst-Pauwels et al., 1983), trifenil estaño (Borst-Pauwels et al., 1983), y octilamino éster (Dufour et al., 1980). Con la

## HIPOTESIS

La salida de potasio de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* es un fenómeno ticausal que se activa por compuestos catiónicos no relacionados estructuralmente. La caracterización de la salida de potasio de la levadura inducida por una serie de compuestos catiónicos no relacionados estructuralmente permitiría, en primera instancia, conocer las condiciones en las que se da la salida y también daría luz sobre el tipo de transportadores involucrados en el fenómeno. Adicionalmente, el conocimiento de las interacciones de los compuestos catiónicos con las levaduras nos permitiría contar con una serie de compuestos con los cuales evaluar la relevancia fisiológica de los transportadores en el control de la homeostasis del potasio.



## V. OBJETIVOS:

### **General:**

Caracterizar la salida de potasio de la levadura inducida por el tratamiento con compuestos catiónicos; con el fin de tratar de plantear generalizaciones y/o la mecánica del fenómeno.

### **Particulares**

- Determinar el efecto que diferentes valores de carga de superficie tienen sobre la salida de potasio inducida en levaduras por el tratamiento con compuestos catiónicos.
- Determinar la salida de potasio inducida por compuestos catiónicos en presencia o ausencia de glucosa y análogos no metabolizables de la glucosa.
- Determinar la salida de potasio inducida por compuestos catiónicos a diferentes valores de contenido interno de potasio.
- Determinar los cambios en el pH interno, bombeo de protones y potencial de membrana por el tratamiento con compuestos catiónicos.
- Determinar el efecto que cambios en la presión osmótica tienen sobre la salida de potasio provocada por los agentes catiónicos empleados.

## VI. MATERIALES Y METODOS.

### VI.1. Cepa y condiciones de cultivo:

Se utilizó una cepa de levadura *Saccharomyces cerevisiae* aislada a partir de una colonia de la levadura comercial La Azteca. Las células se cultivaron a partir de 25 ml de un precultivo de 24 horas, el volumen final del medio de cultivo fue 500 ml. El medio de cultivo utilizado para el precultivo y el cultivo fue YPD (2% de glucosa, 2% de peptona y 1% de extracto de levadura). El medio de cultivo inoculado con los 25 ml del precultivo se dejó crecer por 24 horas en una mesa de agitación a 250 rpm y a 30°C de temperatura

Las células se cosecharon centrifugando 10 minutos a 4,000 rpm en un rotor GS3, en una centrífuga Sorvall RC-5B con temperatura controlada. El paquete conteniendo las células, se colectó y se resuspendió en agua destilada dos veces, para después resuspenderlo al 10% y ayunarlas por 14 horas en la misma mesa de agitación. Posteriormente, las levaduras se colectaron por centrifugación y el paquete celular se lavó en agua destilada para volver a centrifugarlas y resuspenderlas. Al final se resuspendieron a una relación de 0.5 g de células/ml y se mantuvieron en hielo para usarlas en el curso del mismo día.

### VI.2. Determinación del potasio externo.

Los cambios en la concentración de potasio externo se registraron en forma continua utilizando un electrodo selectivo para potasio (Orion Research 9319), conectado a un analizador de iones (Beckman selection 2000). Los datos se capturaron utilizando un software especialmente diseñado para el laboratorio por el Ing. W. Martínez. Las determinaciones se realizaron en 10 ml de un medio que contenía 2 mM de Mes-TEA, pH 6.0, 10 mM de glucosa y 25 mg de levaduras frescas. En algunos casos, las determinaciones se hicieron con variaciones en la composición del medio que se indican en los pies de figura. Durante el experimento la celda se mantuvo siempre a 30°C y con agitación continua.

### **VI.3. Bombeo de protones.**

La determinación de la actividad de la bomba de protones se realizó registrando continuamente los cambios en la concentración extracelular de protones utilizando un electrodo de pH (Cole Parmer 60648) conectado a un analizador de iones Beckman selection 2000. Los datos se capturaron utilizando un software especialmente diseñado para el laboratorio. El medio y las condiciones de incubación fueron las mismas que las descritas en el apartado anterior.

### **VI.4. Determinación del pH intracelular.**

Este parámetro se determinó siguiendo los cambios de fluorescencia de la piranina (ácido 8-hidroxi-1,3,6-piren-tiosulfónico) introducido por electroporación (Peña et al., 1995). La electroporación se llevó a cabo utilizando un electroporador Bio-Rad Gene Pulser, con un controlador de pulsos, usando una mezcla de 0.7 ml de la suspensión celular mas 20  $\mu$ l de piranina 100 mM. Para la electroporación se aplicó un pulso de 1,500 V a una capacitancia de 25  $\mu$ F y una resistencia de 200  $\Omega$ . Después del pulso de 3 mseg aproximados de duración, las células se centrifugaron por 10 seg en una microfuga Beckman y se lavaron tres veces; posteriormente se resuspendieron en agua a su concentración original de 0.5 g/ml. Los cambios de fluorescencia a 460-520 nm se siguieron en un espectrofluorómetro DMX-1000 (SLM instruments, Urbana, Ill.). Durante las determinaciones la celda se mantuvo a 30°C.

### **VI.5. Estimación del potencial de membrana.**

El potencial de membrana se estimó siguiendo los cambios de fluorescencia de 0.25  $\mu$ M de la cianina DiSC<sub>3</sub> (3) (ditiarcobocianina, Molecular Probes) (Peña et al., 1984). Los cambios de fluorescencia a 540-590 nm se siguieron en un espectrofluorómetro DMX-1000 (SLM Instruments), manteniendo la celda a 30°C. 25 mg de células se incubaron en 50 mM de glucosa, 10 mM MES-TEA pH 6.0, 10  $\mu$ M de pentaclorofenol y 10 mM de CaCl<sub>2</sub>.

#### **VI.6. Transporte de rubidio.**

Estos experimentos se llevaron a cabo como sigue: 50 mg de células frescas se incubaron en 1 ml de un medio que contenía amortiguador MES-TEA 5 mM, pH 6.0, glucosa 50 mM y diferentes concentraciones de  $^{86}\text{Rb}^+$  desde 50  $\mu\text{M}$  hasta 20 mM. A los 15, 30 y 45 segundos y a 1, 2, 4 y 8 minutos se retiraron alícuotas de 100  $\mu\text{l}$  para filtrarlas a través de un filtro Millipore de 0.45  $\mu\text{m}$  de diámetro promedio de poro. Los filtros se lavaron dos veces con 20 mM de KCl y después se dejaron al aire para secarlos. La radiactividad se midió en un contador de centelleo Beckman LS6500. Las velocidades iniciales se obtuvieron de las gráficas de concentración de rubidio transportado contra tiempo. Los experimentos de inhibición se llevaron a cabo como se describió previamente, sólo que al medio de incubación se le adicionó 50  $\mu\text{M}$  EB, 50  $\mu\text{M}$  DHS, 50  $\mu\text{g}$  DEAE-Dextrán o 20  $\mu\text{M}$  de cloruro de terbio además del resto de los componentes del medio de incubación.

#### **VI.7. Determinación de la carga de superficie.**

La determinación de la carga de superficie se hizo de acuerdo con el método de Theuvenet *et al.* (1984). Se adicionaron 2  $\mu\text{M}$  de 9-aminoacridina a un medio que contenía 2 mM de buffer MES-TEA pH 6.0, 1  $\mu\text{M}$  de antimicina A, diferentes concentraciones de cada uno de los compuestos catiónicos (de 1 a 100  $\mu\text{M}$ ) y 25 mg de levaduras frescas. Las células se mezclaron con el medio de incubación y se centrifugaron inmediatamente después por 10 seg en una microfuga. Los sobrenadantes se colectaron para la determinación fluorométrica de la 9-aminoacridina a 400- 454 nm. La carga de superficie se calculó por la diferencia después de determinar el residual obtenido por el tratamiento con 10 mM de cloruro de magnesio. A partir de las curvas de unión de la 9-aminoacridina contra la concentración del compuesto catiónico se determinó la concentración del compuesto catiónico que inhibe el 50% de unión de la 9-aminoacridina.

#### **VI.8. Carga de las levaduras con $^{86}\text{Rb}$ :**

6 gramos de levaduras frescas se diluyeron al 10 % p/v con una solución de glucosa 10 mM y  $3 \times 10^6$  dpm de  $^{86}\text{Rb}^+$  100mM. La mezcla de incubación se transfirió a tubos Falcon y se incubaron durante 24 horas a 4°C con agitación continua. Después de este

tiempo las células se centrifugaron y se lavaron dos veces con agua destilada, para después resuspenderlas al 50 % p/v para usarlas en experimentos de salida de  $^{86}\text{Rb}^+$ .

#### **VI.9. Determinación de la salida de $^{86}\text{Rb}^+$ :**

Para determinar la salida de  $^{86}\text{Rb}^+$  se utilizaron células que previamente habían sido cargadas con este catión. 50 mg de células previamente cargadas con  $^{86}\text{Rb}$  se incubaron en 1 ml de un medio que contenía amortiguador MES-TEA 5 mM, pH 6.0 y glucosa 50 mM, con o sin cada uno de los compuestos catiónicos siguientes: 50  $\mu\text{M}$  de cloruro de terbio, 50  $\mu\text{M}$  de DHS, 50  $\mu\text{M}$  de EB o 50  $\mu\text{g}$  de DEAE-dextrán. Después de incubar 5 minutos a 30°C, se retiraron alícuotas de 100  $\mu\text{l}$  de muestra y se filtraron a través de un filtro Millipore de 0.45  $\mu\text{M}$  de diámetro promedio. Los filtros se lavaron dos veces con KCl 20 mM, se les dejó secar al aire y después se procedió a medir la radiactividad con un contador de centelleo Beckman LS6500. La salida de  $^{86}\text{Rb}^+$  se determinó después de restar la radiactividad residual de las células control sin el compuesto catiónico los valores de los filtros que contenían las células tratadas con los diferentes compuestos catiónicos. El contenido de  $^{86}\text{Rb}^+$  en el control sin tratar permaneció sin cambio aún después de 30 minutos de incubación.

#### **VI.10. Determinaciones de la fijación de terbio:**

Las determinaciones de la unión de terbio, así como de la máxima unión de terbio y las constantes de disociación se hicieron midiendo las concentraciones libres de terbio remanentes después de la incubación de las células. La incubación se realizó de la manera siguiente: 25 mg de células frescas se depositaron en 5 ml de un medio que contenía 5 mM de MES-TEA, pH 6.0, diferentes concentraciones de cloruro de terbio desde 2  $\mu\text{M}$  hasta 30  $\mu\text{M}$ . Las células se incubaron por un minuto y después se centrifugaron, recolectando el sobrenadante para las determinaciones de terbio. El catión se midió después de agregar a las alícuotas del sobrenadante 20  $\mu\text{M}$  de ácido dipicolínico en 5 mM de MES-TEA pH 6.0 a un volumen final de 5 ml. Los cambios de fluorescencia se

## VII. RESULTADOS

### VII.1. Efectos de los distintos compuestos catiónicos sobre la salida del potasio de la levadura.

Los primeros experimentos se encaminaron a establecer comparaciones en la capacidad de los agentes más comúnmente utilizados por otros autores para provocar la salida del  $K^+$ . Como puede verse en la figura 1, la salida del potasio promovida por los compuestos catiónicos DEAE-dextrán(DEAE-D), cloruro de terbio ( $TbCl_3$ ), dihidroestreptomicina (DHS) y bromuro de etidio (EB) requiere la presencia de glucosa, hecho que ya habían reportado Peña y Ramírez (1991). Respecto a la salida de potasio promovida por el terbio, parece ser que el tamaño atómico de este catión que es semejante al del  $Ca^{2+}$  (Hughes,1981) y su reactividad semejante frente a diferentes ligandos (Hughes,1981), pudieran explicar la sustitución del  $Ca^{2+}$  por el  $Tb^{3+}$ , con la concomitante liberación del  $Ca^{2+}$  de la superficie. Barba-Behrens et al. (1990) ha propuesto que los grupos guanidío contenidos en la fracción estreptidina de la DHS, pueden fijar calcio, además de que pudieran unirse a los sitios con carga negativa en la superficie celular.

Las levaduras, al ser colocadas en el medio mostraron una salida muy rápida de  $K^+$ , tanto en presencia como en ausencia de glucosa; sólo que en presencia del sustrato lo recapturan rápidamente (figura 1A vs figura 1B). En presencia de glucosa y los compuestos catiónicos antes citados, no se produjo recaptura de  $K^+$  por las levaduras, sino un aumento constante en su salida. Este comportamiento no se observó cuando en el medio no había glucosa o etanol (no ilustrado).

Los resultados de Peña y Ramírez (1991), para el caso del  $Tb^{3+}$ , mostraron que la salida se inhibió en presencia de sales de  $Mg^{2+}$  y de  $Ca^{2+}$  en el medio de crecimiento. De igual manera, cuando se suplementa al medio YPD (de bajo contenido de sales) con  $Mg^{2+}$  o  $Ca^{2+}$  tampoco se observó la salida de potasio. Tal situación parecería indicar que la carga de superficie negativa del exterior de la célula participaba en la mediación del efecto de salida de potasio causada por la presencia de los compuestos catiónicos en el medio. Al respecto, Elferink y Booij (1975) reportaron que el EDTA intensifica el efecto

de los compuestos catiónicos sobre la salida de potasio de la levadura. La explicación de tal comportamiento parece ser el aumento de la carga negativa en la superficie de la levadura, generada por la formación de complejos de  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$  con el EDTA. Por tal motivo se decidió investigar si el aumento de la carga de superficie inducida por el EDTA también afectaba de la misma manera la salida de potasio de la levadura inducida por los compuestos catiónicos utilizados por nosotros. Nuestros resultados (figura 2) concuerdan parcialmente con lo reportado previamente (Elferink y Booij, 1975), en el sentido de que no todos los agentes se comportaron igual, sino que se observaron tres tipos diferentes de efectos de los compuestos catiónicos en presencia del EDTA:

- Se inhibió totalmente el efecto de salida de potasio inducido por  $\text{TbCl}_3$ .
- Se encontró una inhibición parcial y en algunos casos total (no mostrado) del efecto inducido por el DEAE-dextrán.
- Se produjo un aumento del efecto de salida de potasio inducidos por EB y DHS.

Debe señalarse que el EDTA por sí mismo induce una pequeña salida de potasio de la levadura, la cual pudiera atribuirse al equilibrio ácido-base del EDTA que en su forma de ácido libre genere los protones que se unan a los sitios de activación del transporte de potasio; trayendo como consecuencia la inhibición de la recaptura del potasio por la levadura (Borst-Pauwels et al., 1971). Es también posible que el agente quelante remueva de la superficie de la levadura principalmente los cationes divalentes que se requieren para dar mayor estabilidad a la membrana de la célula.

Sin embargo, el aumento de la salida de potasio que el EDTA produjo en presencia de EB y DHS en ningún caso fue acumulativo. Es decir, se produjo un incremento abrupto en la salida de potasio y, en algunos casos, hubo desaparición del retardo que se observa con EB y DHS (esto último no mostrado en la figura 2).

El hecho de que el EDTA no intensificara el efecto del  $\text{TbCl}_3$ , a pesar de que aumenta la carga negativa de la superficie, nos llevó a realizar experimentos de conductividad para discriminar si estaba ocurriendo algún tipo de interacción del  $\text{Tb}^{3+}$  con el EDTA, y aún entre el DEAE-D y el EDTA, que disminuyeran la disponibilidad del  $\text{TbCl}_3$  y del DEAE-D como efectores de la respuesta de salida de potasio. Los resultados que se muestran en

la tabla 1, son congruentes con la existencia de interacciones  $Tb^{3+}$ -EDTA y DEAE-D-EDTA; a juzgar por la disminución de la conductividad del  $TbCl_3$  y el DEAE-D en presencia del EDTA. Nuevamente, si se revisan los datos de la tabla 1, observamos que a mayor disminución de la conductancia corresponde una mayor inhibición de la salida del potasio; es decir, que el  $TbCl_3$ , cuyo efecto sobre la salida del potasio disminuyó más, en presencia de EDTA, interactúa más con el EDTA, y el DEAE-D que se bloquea parcialmente por el EDTA, interactúa menos con éste. Inferimos de estos resultados que es necesaria la presencia de una entidad química  $C^{n+}$  libre como efectora de la respuesta de salida de potasio y que al disminuir ésta, disminuye el efecto.

## VII.2. Posible permeabilización de la levadura por los compuestos catiónicos.

Peña y Ramírez (1991) señalan que el hecho de que los compuestos catiónicos induzcan la salida de potasio de una manera dependiente de energía, indica que se requiere la integridad de la célula y sus funciones metabólicas durante la salida de potasio; aunque apuntan que no se puede descartar que los compuestos catiónicos provoquen la lisis celular liberando el potasio celular al medio. Otros autores como Passow et al. (1959), Passow y Rothstein (1960) y Massart et al. (1947), al referirse al efecto de los compuestos catiónicos sobre la salida del potasio de la levadura, señalan que se trata de un proceso de todo o nada en el que está involucrada la ruptura celular. Por esta razón quisimos investigar si los compuestos catiónicos que utilizamos, estaban provocando la lisis celular; tomando como criterio de ruptura celular la detección de material que absorbiera a 260 nm (fundamentalmente nucleótidos), que saliera por efecto del tratamiento con los compuestos catiónicos.

Los resultados que se presentan en la tabla 2 muestran que de los cuatro compuestos utilizados, el DEAE-D promovió una mayor salida de material que absorbe a 260 nm, y que la salida representaba una proporción importante del valor obtenido con el detergente CTAB a una concentración de 200  $\mu M$ , el cual rompe las células. No obstante, es necesario señalar que el DEAE-D no fue, a la misma concentración utilizada, el compuesto que más potasio celular liberara (figura 1). Este experimento muestra la falta de correlación entre la liberación de potasio celular y la liberación de material que



absorbe a 260 nm. Es importante señalar que la DHS tampoco mostró una correlación entre la magnitud del potasio que saca y la magnitud del material que absorbe a 260 nm liberado; es decir, aunque indujo la salida de  $30 \pm 2.5 \mu\text{M}$  de potasio (figura 1 y tabla 3), produjo la salida de una cantidad pequeña de material que absorbe a 260nm (Tabla 2). Debe señalarse que en este experimento no se incluyó al EB, porque absorbe luz a 260 nm.

El compuesto más interesante en este sentido, es el  $\text{TbCl}_3$ , que a pesar de producir la salida del potasio intracelular, no mostró ningún efecto sobre la salida de material que absorbe a 260nm (Tabla 2).

### VII.3. Liberación del calcio epitelial.

En vista de que los compuestos catiónicos, a juzgar por los resultados anteriores, indujeron la liberación del potasio de una manera relacionada con la carga de superficie negativa; quisimos investigar si las variaciones en la carga de superficie estaban relacionadas con variaciones en los niveles del calcio extracelular, esto en vista de que la remoción de calcio extracelular está relacionada con la estabilidad de la membrana. Para tal efecto, medimos los niveles de calcio extracelular con un electrodo específico de calcio, en las mismas condiciones en que se da la liberación del potasio celular.

Los resultados consignados en la tabla 3 y en la figura 3 muestran claramente que tanto la DHS como el  $\text{TbCl}_3$  provocaron cambios en la concentración del calcio extracelular, con una cinética de liberación rápida que se manifestaba de una manera independiente de la presencia del sustrato (glucosa). Esto nos podría hacer pensar que los cambios inducidos por el  $\text{TbCl}_3$  y la DHS se debieran a la remoción del calcio epitelial; es decir, que tanto la DHS como el  $\text{TbCl}_3$ , aún a bajas concentraciones (1 a  $5 \mu\text{M}$ ), disminuyeran la afinidad del calcio por sus sitios de unión en la superficie celular externa, o bien sustituyan a éste de sus sitios de fijación a la membrana. El DEAE-D, por el contrario, y como se ve en la figura 3, no produjo la remoción del calcio epitelial, ni en presencia ni en ausencia de sustrato.

#### VII.4. Determinación de la carga de superficie.

La determinación de la carga de superficie de las células se realizó con el fin de evaluar la capacidad de los compuestos catiónicos empleados para abatir la carga de superficie de la levadura. Con ello, el interés era también poner de manifiesto la participación de la carga de superficie en la salida de potasio inducida por los compuestos catiónicos.

La medida se hizo determinando la unión de la 9-aminoacridina a los sitios con carga negativa en la superficie celular, bajo el supuesto de que si los compuestos catiónicos se unen a los sitios con carga negativa de la superficie celular, disminuirían los sitios para la unión de la 9-aminoacridina.

Los datos de la tabla 3 muestran la concentración del compuesto catiónico que disminuye en un 50% la carga de superficie; es decir, que disminuye la unión de la 9-aminoacridina en esa proporción, y se calcularon de las correspondientes curvas de unión de la 9-aminoacridina contra la concentración del compuesto catiónico, que no se muestran en los resultados.

Se puede ver que se requieren bajas concentraciones de DHS (5  $\mu\text{M}$ ), para disminuir la carga de superficie en un 50%, lo que quiere decir que este compuesto se une con una gran afinidad a los sitios con carga negativa de superficie, que es incluso mayor que la concentración correspondiente a los compuestos catiónicos del tipo  $\text{C}^{3+}$  como Al y La, que de acuerdo con lo reportado por Theuvenet et al (1984), la concentración que abate el 50% de la carga de superficie es de alrededor de 10  $\mu\text{M}$ .

Los resultados que obtuvimos para el  $\text{TbCl}_3$  son de  $10 \pm 6.1 \mu\text{M}$  (tabla 3) los cuales concuerdan con los de estos autores. Los datos de la tabla 3 también indican que tanto la DHS ( $5 \pm 2.3 \mu\text{M}$ ) como el  $\text{TbCl}_3$  son muy afines por las cargas negativas de superficie. Sin embargo, como el método de la unión de la 9-aminoacridina, presenta el inconveniente de que el colorante se introduce a la célula y las determinaciones se tienen que hacer rápido para poder obtener resultados confiables, en nuestro laboratorio Judith González y yo hemos estado tratando de establecer un método para medir la carga de superficie. Este método se basa en la determinación del  $\text{Tb}^{3+}$  libre en el sobrenadante

después de centrifugar las levaduras, el cual forma un complejo fluorescente con el ácido dipicolínico. Utilizando este método la unión máxima de terbio y su constante de disociación en ausencia de glucosa fueron  $2.15 \pm 0.57$  nmoles/mg de levadura (peso fresco) y  $9.49 \pm 0.42$   $\mu\text{M}$ , respectivamente. En presencia de glucosa la unión máxima fue  $2.08 \pm 0.46$  nmoles/mg de lev (peso fresco) con una constante de disociación de  $8.48 \pm 1.35$   $\mu\text{M}$ .

En los resultados de la tabla 3 se puede notar que el DEAE-D no fue capaz de desplazar totalmente a la 9-aminoacridina de sus sitios de unión, lo cual quiere decir que si se une a los sitios con carga negativa de la superficie, lo hace con mucha menor afinidad que la 9-aminoacridina. Es decir, estos resultados no necesariamente descartan que el DEAE-D, tenga efecto sobre la carga de superficie. Otro elemento importante consiste en que las concentraciones necesarias para desplazar a la 9-aminoacridina no coinciden con las que se requieren de los diferentes agentes para provocar la salida del potasio.

#### **VII.5. Efecto de los compuestos catiónicos sobre la salida de $^{86}\text{Rb}$ de la levadura.**

La salida neta de potasio que se detectó con el electrodo específico de potasio puede ser el reflejo de un aumento en la salida del potasio celular o la inhibición del sistema de captura (transporte) del mismo. Por ello era necesario establecer con certeza los efectos de los compuestos catiónicos sobre la salida de potasio.

Para lograr este objetivo se determinó el efecto de los distintos compuestos catiónicos sobre células que previamente habían sido cargadas durante 24 horas con  $^{86}\text{Rb}^+$ . Armstrong y Rothstein (1964) reportaron que este catión metálico puede transportarse por el mismo acarreador del potasio. De igual manera, puede salir de la célula por un intercambiador  $\text{K}^+/\text{H}^+$  según Ramírez et al (1996) y Camarasa et al (1996), o por un canal sensible al voltaje para  $\text{K}^+$ , según Gustin et al (1988) y Bertl y Slayman (1992).

En estos experimentos, tomando como valor aproximado del agua intracelular de la levadura de 0.5 ml por gramo de peso húmedo, la concentración celular calculada de  $^{86}\text{Rb}$  al cabo de 24 horas de incubación, en ningún caso fue mayor de 20 mM, lo que en promedio representa menos del  $15 \pm 4.5\%$  del contenido celular de potasio.

Lo que inmediatamente se observa de los resultados de la figura 4, es que prácticamente ni la DHS ni el  $TbCl_3$  afectaron la salida de  $^{86}Rb$ . Por el contrario, el EB aumenta notoriamente la salida de  $^{86}Rb$ .

Por otra parte, el aumento de la carga de superficie producido por la presencia de EDTA no aumentó de manera significativa la salida de  $^{86}Rb$  promovida por los compuestos catiónicos, como se puede juzgar de los resultados de las figura 5. Estos últimos resultados, cuando se les compara con aquellos de la figura 4 realizados en ausencia de EDTA, no muestran diferencias significativas. Lo anterior significa que si bien los compuestos catiónicos afectan la carga de superficie, el aumento de ésta no tiene influencia en la salida de  $^{86}Rb$ . Sin embargo, debe hacerse notar que la concentración final de  $^{86}Rb$  alcanzada es menor que la concentración interna de potasio, por lo que es muy probable que el  $^{86}Rb$  presente poca competencia frente al potasio por sus sistemas de salida. Esto podría evitar que se viera algún efecto de los agentes estudiados sobre la salida.

Este parece ser el caso al menos para el  $TbCl_3$ , la DHS y el DEAE-D, los cuales afectaron muy poco la salida de  $^{86}Rb$ . Sin embargo, el EB afecta mas la salida de  $^{86}Rb$ , indicando que parte del efecto del EB pudiera deberse a ruptura celular como lo señalan Theuvenet et al (1983).

No se puede pasar por alto el hecho de que el DEAE-D también mostró poco efecto sobre la salida del  $^{86}Rb$ , tanto en presencia como en ausencia de EDTA. Esto es también de llamar la atención, en vista de que en reportes de Huber-Wälchli y Wiemken (1979) se llegó a la conclusión de que permeabiliza de manera diferencial la membrana plasmática, sin afectar la vacuolar; y es una práctica común utilizar el DEAE-D como método para diferenciar los contenidos citoplásmico y vacuolar de potasio. Debe mencionarse también que Ohsumi et al. (1988) reportaron que el uso del DEAE-D da resultados variables, por lo que este método no es muy confiable para medir las pozas citoplásmica y vacuolar de potasio. Por otra parte, el peso molecular del DEAE-D utilizado es de 400,000, lo que probablemente haga difícil su paso por la membrana celular, debido a la barrera que para este tamaño de compuestos representa la pared de la célula (Gerhardt y Judge, 1964; Scherer et al., 1974).

Los resultados de la figura 6 muestran que el DEAE-D prácticamente no afecta la membrana plasmática, yz que de otra manera hubiera promovido una salida masiva de  $^{86}\text{Rb}$ . Sin embargo, estos resultados parecieran contradictorios con los mostrados previamente en la tabla 2, ya que por un lado se muestra que el DEAE-D promueve la salida de material que absorbe a 260 nm, y por otro no logra la salida de  $^{86}\text{Rb}$  en la misma magnitud.

Los resultados de la tabla 4 indican que DHS, DEAE-D y  $\text{TbCl}_3$ , a las concentraciones usadas, afectan muy poco la salida de  $^{86}\text{Rb}^+$  ( en el orden de 1 a 3 %) después de 5 minutos de tratamiento; y sólo es claro por los resultados de la tabla 4 y aquellos de las figuras 4 y 5, que el EB puede estar permeabilizando, al menos parcialmente, a la célula, tal como ya lo reportaron Theuvenet et al (1983)

#### VII.6. Determinación del contenido de potasio.

Los experimentos de Rothstein y Bruce (1958a y b) muestran que la incubación de levaduras con  $\text{K}^+$  aumenta gradualmente la velocidad de salida de  $\text{K}^+$  en un medio carente de  $\text{K}^+$ ; es decir, existe una mayor salida de potasio cuando mayor es la diferencia de concentración de potasio entre el interior y el exterior celular. Esto no se cumpliría si los compuestos catiónicos usados permearan la célula o modificaran *in situ* los parámetros cinéticos para la salida del potasio. En consecuencia, si estos compuestos catiónicos promovieran la ruptura celular se tendría un rápido equilibrio en la concentración de  $\text{K}^+$  en los compartimentos intracelular y extracelular. En caso contrario, la evidencia sugeriría que el compuesto catiónico no permea la célula y su efecto lo realiza desde el compartimento extracelular.

Para esto medimos la salida de  $\text{K}^+$  promovida por los compuestos catiónicos a dos concentraciones de  $\text{K}^+$  internas diferentes, incubando por 30 minutos las células, que se habían ayunado 14 a 15 horas, en un medio que contenía MES-TEA 2 mM, pH 6.0 ,  $\text{KCl}$  20 mM y glucosa 10 mM. El contenido celular de potasio se logró bajar después de lavar el paquete celular con agua desionizada de 5 a 7 veces. En el mejor de los casos la

concentración interna mínima de potasio obtenida después de los lavados fue del orden de 100 mM.

La figura 7 muestra que la salida de potasio inducida por  $TbCl_3$  dependía del contenido interno de potasio, aunque debe hacerse notar que el efecto a mayor contenido de potasio interno no resultó ser muy grande si se le compara con los determinados con el electrodo (figuras 1 y 2). Al disminuir el contenido interno de potasio hasta un  $20 \pm 6.3\%$ , la salida de potasio se vio prácticamente anulada, inclusive aquella que se obtuvo por el solo hecho de lavar con agua desionizada.

En la figura 8 se consignan los resultados obtenidos con DEAE-D. De nuevo, como en el caso de los obtenidos con  $TbCl_3$ , existe una clara dependencia del efecto del catión con la concentración interna de potasio. A diferencia de los datos obtenidos con  $TbCl_3$  (figura 7), el DEAE-D promovió una salida mayor de potasio, incluso en las células lavadas, que en este experimento tenían el 50% del contenido celular de potasio de las células incubadas, presentando este efecto semejanza con la salida de  $^{86}Rb$  inducida por el mismo compuesto (figura 6).

Por su parte, el EB (figura 9) promovió la salida de potasio de una manera independiente de la concentración interna de potasio, a pesar de que la diferencia de concentración de potasio interno fue mayor del 50% con respecto a las concentración de potasio que presentaban las células incubadas previamente con potasio.

La DHS también produjo la salida de potasio de una manera independiente de su concentración interna (figura 10), aunque a diferencia de la salida promovida por el EB, se observó salida aún a concentraciones bajas de DHS.

Los resultados de las figuras 7, 8, 9 y 10 muestran dos tipos de comportamiento: por una parte, el efecto tanto del  $TbCl_3$  como del DEAE-D dependió de la concentración de potasio interno para manifestarse; es decir, a menor concentración interna de potasio, tendía a desaparecer el efecto promovido por el  $TbCl_3$  y el DEAE-D sobre la salida de potasio de la levadura (Figuras 7 y 8). De hecho, a bajas concentraciones de potasio interno, del orden de 100 a 150 mM, el DEAE-D y particularmente el  $TbCl_3$  no lograron, en presencia de glucosa, promover la salida de potasio de la levadura.

Por otra parte, tanto el EB como la DHS indujeron la salida de potasio de una manera independiente de su concentración interna (figuras 9 y 10). Es decir, su efecto se observó aún a bajas concentraciones de potasio interno (del orden de 120 a 150 mM).

#### VII.7. Efecto de los compuestos catiónicos sobre el transporte de $^{86}\text{Rb}^+$ .

La DHS, el  $\text{TbCl}_3$ , el EB y el DEAE-D afectan el transporte de  $^{86}\text{Rb}$  de dos maneras.

- Disminuyendo la  $V_{\text{max}}$  para el transporte de  $^{86}\text{Rb}$ , sin afectar sensiblemente la  $K_m$ ; ésto sucede al transporte de  $^{86}\text{Rb}$  en presencia de DHS,  $\text{TbCl}_3$  y DEAE-D. De estos compuestos, el  $\text{TbCl}_3$  y la DHS son lo que afectan más la  $V_{\text{max}}$ ,  $5.2 \pm 0.65$  y  $4.96 \pm 1.96$  nmoles/mg lev min, respectivamente, respecto al valor control de  $18.3 \pm 3.2$  nmoles/mg de levadura minuto.
- Disminuyendo la afinidad del  $^{86}\text{Rb}$  por los sitios que lo unen para su posterior transporte y, en menor grado, la  $V_{\text{max}}$ . Tal es lo que sucede al transporte de  $^{86}\text{Rb}$ , en presencia del EB, el cual aumenta la  $K_m$  de  $0.8 \pm 0.32$  a  $3.6 \pm 1.7$  mM (tabla 5). Estos resultados concuerdan con aquellos reportados por Peña y Ramírez (1975) respecto a la disminución de la afinidad y, a diferencia de los mismos, nosotros pudimos determinar también una disminución en la  $V_{\text{max}}$ .

#### VII.8. Efecto del DEAE-D y la DHS sobre la salida de potasio. Efecto del $\text{MgCl}_2$ .

Dado que los resultados anteriores mostraron la participación de la carga de superficie en la mediación de la respuesta de los compuestos catiónicos, se creyó conveniente conocer el efecto de tales compuestos catiónicos, a un valor mínimo de carga de superficie. Para lograrlo, se incubaron los compuestos catiónicos con las levaduras en presencia de  $\text{MgCl}_2$  1 mM. En principio, si el efecto promovido por los compuestos catiónicos depende de la unión de los mismos a sitios con carga negativa en la superficie de la levadura, entonces, disminuirá el efecto, al disminuir el número de sitios disponibles para que se unan los compuestos catiónicos a la levadura.

Como puede verse de la figura 11, la salida de potasio en presencia de DEAE-D disminuyó notoriamente al disminuir la carga de superficie de la célula (por el  $\text{MgCl}_2$ ), siendo incluso la salida menor que el control de glucosa. Los resultados de la figura 12,

realizados con levaduras ayunadas 15 horas, muestran basicamente un comportamiento similar, en el sentido de que se inhibió la salida de potasio inducida por DEAE-D. Sin embargo, la inhibición fue menor que la obtenida con células ayunadas por 5 horas (figura 11), las cuales se mostraron más sensibles a la inhibición por la disminución de la carga de superficie. Aparentemente esta discrepancia se debió a que las células ayunadas menor tiempo tuvieron una menor carga de superficie que las ayunadas por 15 horas (alrededor de 3.2 veces menos). De hecho en estas últimas, la inhibición de la salida de potasio inducida por DEAE-D, no logró revertir la salida al nivel del control o a una menor salida que el control como se logró en las células que se ayunaron por 5 horas.

Por lo que respecta a la salida de potasio inducida por la DHS, también se mostró sensible a la disminución de la carga de superficie por el  $MgCl_2$  (figura 13). Sin embargo, a diferencia de los resultados obtenidos con el DEAE-D, no se revirtió el efecto al grado de observar una entrada neta de potasio (como en el caso del DEAE-D en células ayunadas 5 horas), sino siempre una salida de potasio, mayor a mayor tiempo de ayuno (esto último no mostrado). En resumen, en los resultados de las figuras 11, 12 y 13 se muestra que el cloruro de magnesio inhibe la salida de potasio inducida por DEAE-D y DHS, independientemente de la concentración interna de potasio. Sin embargo, se presentan algunas diferencias:

- El DEAE-D se mostró más sensible a la inhibición por cloruro de magnesio que la DHS. Se observó también que el cloruro de magnesio revirtió el efecto del DEAE-D hasta el grado de observarse una entrada neta de potasio a la célula.
- El efecto de la DHS, aunque se inhibe por el cloruro de magnesio, muestra una menor sensibilidad a la inhibición, observándose que el cloruro de magnesio no logra revertir el efecto de la DHS, como para medir una entrada neta de potasio.
- Estos resultados, están de acuerdo con las diferencias con que estos agentes catiónicos desplazan a la 9-AA de los sitios con carga negativa de la superficie de la célula (tabla 3).



### VII.9. Efecto del sorbitol sobre la salida de potasio.

Ya antes se presentaron resultados que muestran que la salida de potasio promovida por algunos compuestos catiónicos dependía de la concentración interna de potasio. Visto de otra manera, la salida de potasio parece depender de diferencias de la presión osmótica entre los compartimentos intracelular y extracelular. Es decir, a mayor diferencia, mayor salida de potasio, aún en ausencia de los compuestos catiónicos.

Por su parte, los resultados de Gustin et al (1988) muestran que existe actividad de un canal de potasio asociada a la membrana plasmática, la cual es activable por cambios en el voltaje, pero también por la presión ejercida de manera longitudinal a la membrana, y por estiramiento de la misma.

Aunado a todo esto, Gloria Martínez en nuestro laboratorio ha observado que las levaduras de panadería crecidas en YPD conservan intacta la vacuola, en comparación con aquellas crecidas en un medio con un mayor contenido en sales (Kloet), las cuales muestran un vacuola disgregada o vesiculada. Estos cambios morfológicos pudieran deberse a diferencias en la presión osmótica, dadas las diferentes composiciones de ambos medios de cultivo, y quizá tuvieran influencia sobre la salida de potasio inducida por las moléculas catiónicas, hecho que ya habían observado Peña y Ramírez (1991). Es por ésto que supusimos que si aumentábamos la osmolaridad externa, disminuiríamos las diferencias de presión osmótica entre los compartimentos intra y extracelular. Con ello pretendíamos liberar la membrana plasmática de la presión ejercida por el compartimento intracelular y bloquear cualquier efecto de los agentes catiónicos que dependiera de esas diferencias de presión.

Para lograr lo anterior, se indujo la salida de potasio con DEAE-D y DHS en presencia de sorbitol 0.8 M. En primer lugar, nuestros resultados (figura 15a) muestran que el sorbitol por sí solo no modifica sustancialmente el transporte de potasio en la levadura ayunada 5 horas. Sin embargo, en algunos casos de células sometidas a un ayuno de 15 horas, que además transportaban menos potasio, el sorbitol aumentó el transporte de potasio (figura 15b).

Debe hacerse notar que la concentración 0.8 M de sorbitol no afecta la respiración con glucosa; es decir, no interfiere con la utilización de la glucosa (datos no mostrados).

Como lo indican los resultados de la figura 11, el sorbitol, en células ayunadas por 5 horas inhibió el flujo de potasio inducido por el DEAE-D, de manera tal que incluso se pudo observar una entrada neta de potasio. Este mismo comportamiento pudo observarse en células que fueron sometidas a un ayuno de 15 horas (figura 12), salvo que la inhibición de la salida de potasio inducida por DEAE-D es de tal magnitud, que dicha salida llega a ser despreciable. Dado que la concentración interna de potasio en células ayunadas por 5 horas es de  $227 \pm 34$  mM y la de las células ayunadas por 15 horas de  $172 \pm 27$ , esto quiere decir que a menor concentración interna de potasio, mayor es el efecto de inhibición del flujo de potasio que se logra con el sorbitol.

El hecho de medir una inhibición de la salida de potasio por el sorbitol, en condiciones en las que se observaría una salida neta de potasio, o incluso, de llegar a medir una entrada de potasio en células sometidas a un menor ayuno (5 horas), es incompatible con la pérdida de la integridad celular promovida por el DEAE-D.

Ya se mencionó también que la DHS, a diferencia del DEAE-D, promovió la salida de potasio de una manera independiente a la concentración de potasio interna; por ello juzgamos conveniente evaluar si la inhibición de la salida de potasio que se logró con el sorbitol presentaba las mismas características en presencia de DHS.

La inhibición de la salida de potasio por el sorbitol en presencia de DHS, en células sometidas a un ayuno de 5 horas (figura 13), fue menor que aquella lograda en presencia de DEAE-D (figura 11). Además presentó la misma cinética de salida que cuando sólo hay DHS en el medio. Se encontró también que el sorbitol inhibió el flujo de potasio inducido por la DHS en células sometidas a un ayuno de 15 horas (figura 14), aunque en este caso la inhibición fue mayor y dependiente de la concentración interna de potasio. En ningún caso la inhibición fue mayor a aquella obtenida en presencia de DEAE-D. Otra particularidad que se observó, fue que el sorbitol no revirtió el efecto de la DHS al grado de observar una entrada neta de potasio, lo que se explica por un efecto dual de la DHS, activando la salida de potasio e inhibiendo el transporte del mismo.

Dado el  $TbCl_3$  y el EB registran señal en el electrodo de potasio, no fue posible realizar los experimentos con estos compuestos. También debe notarse que la inhibición de la salida de potasio inducida por DEAE-D y DHS, en presencia de sorbitol, no aumentó más al disminuir la carga de superficie con  $MgCl_2$  y las diferencias observables entre el DEAE-dextrán y la DHS (figuras 11 y 13) son fácilmente atribuibles a diferencias en afinidad que estos dos compuestos catiónicos presentan por la carga de superficie (tabla 3).

La inhibición de la salida de potasio por el sorbitol en presencia del DEAE-D y la DHS no parece ser un fenómeno atribuible al sorbitol mismo, sino un efecto de osmoprotección, dado que la galactosa 0.8 M, reproduce el efecto con las particularidades antes descritas. Es decir, en presencia de DEAE-dextrán y células ayunadas por 15 horas se observa una gran inhibición de la salida de potasio e incluso una entrada neta de potasio a la célula (figura 16). Respecto a la inhibición que la galactosa produjo en células tratadas con DHS, ésta fue sensiblemente menor y no se observó una entrada neta de potasio a las células ayunadas por 15 horas (figura 17).

#### **VII.10. Reversibilidad de los efectos con cloruro de magnesio.**

Los resultados de la tabla 3 indican que el  $TbCl_3$  y la DHS se unen con alta afinidad a los sitios con carga negativa en la superficie de la levadura, mientras que el DEAE-D lo hace laxamente. Si la salida de potasio inducida por estos compuestos catiónicos implica la concentración de los mismo en el exterior, entonces, si se logran remover, se revertiría la salida de potasio. Los resultados mostrados antes indican que al menos el DEAE-D y el  $TbCl_3$  se unen extracelularmente. En principio, se esperaría una fácil remoción del DEAE-D, y en consecuencia, la reversión de la salida de potasio inducida por este compuesto catiónico.

La remoción de los compuestos catiónicos se realizó de la siguiente manera: las células se incubaron con los compuestos catiónicos por 5 minutos, al cabo de este tiempo se centrifugaron y se resuspendieron en  $MgCl_2$ , se volvieron a centrifugar y se lavaron 2 veces con agua desionizada con el fin de diluir el  $MgCl_2$ , el cual inhibe un poco el

transporte de potasio (no mostrado). Después de este tratamiento se siguió el transporte de potasio con el electrodo de potasio, y en un medio que contenía KCl 10  $\mu$ M.

Como se esperaba, la remoción del DEAE-D logró la reversión casi total de la salida de potasio (figura 18), mostrando una cinética de entrada de potasio similar al control de células no tratadas con DEAE-D pero sometidas al tratamiento de lavado con  $MgCl_2$ .

Contrario a lo que se esperaba, la DHS se pudo remover en gran medida, a juzgar por la reversión de la salida de potasio lograda por los lavados con  $MgCl_2$  (figura 19) y de hecho se logró medir una entrada de potasio posterior a una salida inicial que resultó ser menor que la obtenida por el control con DHS sin lavar. Sin embargo, el nivel de entrada no semejó al del control lavado y sin tratar con el DHS.

La remoción del cloruro de terbio por el lavado con cloruro de magnesio resultó en la inhibición de la salida de potasio promovida por este compuesto catiónico. Sin embargo, no logró medirse una entrada neta del potasio a la célula (figura 20). Estos resultados hasta cierto punto eran los esperados en virtud del bajo valor de  $ID_{50}$  calculado para el cloruro de terbio a partir de los datos de la remoción de la 9-aminoacridina, que indican la gran afinidad del terbio por los sitios con carga negativa de la superficie celular (tabla 3). En general, la figura 20 muestra que es posible revertir al menos parcialmente la unión del terbio a la célula con Mg, lo que indica la posibilidad de que el terbio se concentre extracelularmente.

Como puede verse de la figura 21, el bromuro de etidio no logró removerse de la superficie celular, a juzgar porque el lavado con cloruro de magnesio no logró revertir el efecto de salida de potasio inducido por él.

#### **VII.11. Cambios en el pH interno de la levadura en presencia de los compuestos catiónicos.**

Los resultados de Peña y Ramírez (1991) del efecto del cloruro de terbio sobre la salida de potasio de la levadura son congruentes con la existencia de un sistema antiportador  $K^+/H^+$ , activado por el  $TbCl_3$ . A este respecto era interesante saber si los compuestos catiónicos que usamos promovían también la salida de potasio a través de la activación de dicho sistema de intercambio. Fue por esta razón que evaluamos la

influencia de nuestros compuestos catiónicos sobre el pH interno de la levadura, utilizando como sonda la piranina de acuerdo con el método de Peña et al (1995).

La DHS indujo aumentos en el pH interno de la levadura, ya sea que el registro se iniciara con la DHS y las levaduras conteniendo la piranina introducida por electroporación (figura 22A); o bien, la DHS se agregara una vez iniciado el trazo (figura 22B). En cualquiera de los dos casos la tendencia fue hacia el aumento del pH, y al menos para las dos concentraciones probadas, no se observó una dependencia con la concentración de DHS, quizá atribuible a la existencia de mecanismos de compensación.

En términos cualitativos se obtuvo el mismo resultado al descrito anteriormente al agregar DEAE-D a la levadura cargada con piranina. Es decir, el DEAE-D produjo un aumento del pH interno de la levadura, tanto al iniciar el registro con el DEAE-D en la celda de incubación (figura 24 A), como cuando ya iniciado con glucosa se agregó DEAE-D a la celda (figura 24 B). Sin embargo, el rápido aumento del pH interno que se logró al agregar el DEAE-dextrán después de iniciado el registro no concuerda con la cinética de alcalinización que se observó cuando el DEAE-dextrán se agregó desde el inicio del registro; lo que tal vez signifique que las diferencias en el comportamiento del efector catiónico dependan o de pH interno o de potencial de membrana. En los registros también se utilizaron dos concentraciones diferentes de DEAE-D y también se observó el mismo comportamiento ya descrito anteriormente, es decir, no se observó mayor aumento del pH interno con el aumento de la concentración del compuesto catiónico. También existe en este caso un límite máximo de respuesta del sistema que parece estar a un pH de 6.7 a 6.8.

Lo contrario se encontró con el  $TbCl_3$ , el cual provocó la disminución del pH interno. Este comportamiento se pudo observar tanto al agregar  $TbCl_3$  a la celda de incubación desde el inicio del trazo (figura 23 A), como cuando se le agregaba una vez iniciada la determinación con glucosa (figura 23 B). Nuevamente, y a las concentraciones ensayadas, se observó la respuesta independiente de la concentración de cloruro de terbio, mostrando el sistema un límite inferior de respuesta que pudiera ser atribuible a la operación de mecanismos compensatorios que regulen el pH, este límite está alrededor de 6.0 a 6.05. Hasta este punto, todos los resultados

evidencian la posibilidad de que el cloruro de terbio pudiera estar activando un mecanismo antiportador  $K^+/H^+$ .

#### **VII.12. Efecto de los compuestos catiónicos sobre el bombeo de protones.**

En concordancia con los resultados de la sección anterior se muestra el bombeo de protones en presencia de DHS, la cual, según se ve en la figura 25 aumentó esta actividad. En la misma figura se presentan las actividades de bombeo de protones en presencia de DHS y sorbitol 0.8M. En estas condiciones, la DHS no fue capaz de aumentar tanto el bombeo de protones. Sin embargo, el sorbitol no fue capaz de bloquear completamente el efecto que sobre la bomba de protones tiene la DHS (figura 25).

El bombeo de protones de la levadura aumentó también en presencia de DEAE-D, como se esperaría para el aumento del pH interno medido en la sección anterior. Los datos de la figura 26 muestran que efectivamente el DEAE-D indujo un mayor bombeo de protones por la levadura. En esta misma figura también se muestra que el sorbitol 0.8M inhibió el efecto del DEAE-D en mayor grado que para la DHS, hecho que concuerda perfectamente con los descritos atrás sobre los cambios del pH externo.

#### **VII.13. Efecto de los compuestos catiónicos en presencia de otras fuentes de carbono.**

Los resultados hasta ahora presentados seguían sin contestar por qué la salida de potasio inducida por los compuestos catiónicos sólo se observaba en presencia de glucosa (figura 1); es decir, no permitían discriminar si esto se debía a que el metabolismo participara en la mediación del efecto, por ejemplo, por el establecimiento de un potencial de membrana, o por el aumento de la carga de superficie en presencia del sustrato, o por un efecto derivado del metabolismo mismo. Tampoco se podía diferenciar si el sustrato favorecía la interacción compuesto catiónico-superficie celular. Por todo lo anterior, decidimos medir la salida de potasio en presencia de análogos no metabolizables de la glucosa como la 6-desoxiglucosa y la 2-desoxiglucosa.

En el primer caso, este análogo no se fosforila en la posición 6 ni procede la glucólisis en su presencia; en el caso de la 2-desoxiglucosa, este análogo no procede en la vía aunque si se fosforila en la posición 6, sólo se le ha atribuido a dicha fosforilación la acidificación inicial en el pH interno de la levadura (Ramos et al,1989). En este sentido también se descartaría que el efecto de los compuestos catiónicos sobre la salida de potasio pudiera tener como señal la bajada inicial en el pH que se logra por el metabolismo de la glucosa. También se incluyó un azúcar (la xilosa) que no se asimila ni produce la disminución inicial del pH interno (Ho et al,1998).

Los análogos no metabolizables de la glucosa, la 6-desoxiglucosa y la 2-desoxiglucosa, no fueron capaces de sostener la salida de potasio inducida por el DEAE-D (figura 27 A), ni fueron capaces de revertir el efecto del DEAE-D al grado de observarse una entrada neta de potasio a la célula. Esto quiere decir que se requiere del metabolismo celular para que el DEAE-D sea capaz de inducir la salida de potasio de la levadura y que la disminución rápida inicial del pH interno no es una señal derivada del metabolismo involucrada en el proceso de salida de potasio de la levadura, ya que de otra forma se presentaría salida de potasio en presencia de 2-desoxiglucosa. En presencia de xilosa (figura 27 B), el DEAE-D indujo la salida de potasio de la levadura de manera lenta, es decir, se observó un retraso en la respuesta, probablemente relacionado con la capacidad metabólica de la célula para utilizar la glucosa endógena.

Respecto al comportamiento de las células en presencia de DHS y de los análogos de la glucosa, puede verse de la figura 28A que se inhibió la salida de potasio inducida por la DHS al usar como sustrato tanto la 6-desoxiglucosa como la 2-desoxiglucosa. De estos resultados y de aquellos de la figura 27A, se observa que incluso no solo se inhibió la salida de potasio por el DEAE-D y DHS, sino que el grado de respuesta fue menor que cuando no se usó glucosa externa; es decir, con los niveles endógenos de glucosa (no mostrado). El uso de la xilosa no logró hacer evidente la inducción de la salida de potasio por la DHS (figura 28B).

Estos resultados muestran que el metabolismo es esencial para que DEAE-D y la DHS promuevan la salida de potasio de la levadura; también muestran que esta salida de

potasio no responde a una señal de acidificación temporal del interior celular. Probablemente el efecto de estos dos compuestos catiónicos dependa de la fermentación dado que la xilosa, que no se asimila (Ramos et al, 1989) ni es fermentable, no logró poner de manifiesto la salida de potasio de la levadura por los compuestos catiónicos ensayados. Si la diferencia en la utilización de la glucosa vs la xilosa, permite un rápido establecimiento del potencial de membrana en presencia de la glucosa, entonces, las diferencias en la salida de potasio podrían ser atribuibles a este hecho.

#### **VII.14. Efecto de los compuestos catiónicos sobre el potencial de membrana.**

El potencial de membrana se estimó midiendo la fluorescencia de la cianina DiSC<sub>3</sub> de acuerdo con el método de Peña et al (1984). Una vez establecido el potencial de membrana (2 minutos), se agregó cada uno de los compuestos catiónicos y se registró de manera continua el efecto de estos compuestos sobre el potencial preestablecido. Una de las cosas que debe hacerse notar es que en principio se requerían concentraciones mayores que las necesarias para lograr la salida de potasio de la levadura; es decir, al utilizar las concentraciones de los compuestos catiónicos en el orden 20 a 50  $\mu\text{M}$  no se observaron cambios significativos en el potencial de membrana, a pesar de que a estas concentraciones se promovió la salida de potasio de la levadura.

Sólo concentraciones de  $\text{TbCl}_3$  cincuenta veces mayores (2.5 mM) abatieron un  $28 \pm 3.3\%$  la fluorescencia del control; bajo condiciones similares, 2.5 mM de DHS solo produjo una disminución del  $11 \pm 5\%$ . DEAE-D usado a la misma concentración a la que inducía la salida de potasio (50  $\mu\text{g}$ ), sólo abatió un  $4 \pm 1.8\%$  la fluorescencia del control. En estos experimentos, se utilizó 20 mM de KCl como control y se obtuvo una disminución de la fluorescencia del  $16 \pm 3.9\%$ .



TABLA 1. Determinación de la conductividad de los compuestos catiónicos en presencia de EDTA.

COMPUESTO	CONDUCTIVIDAD $\mu\text{S}$
TbCl <sub>3</sub> 5 $\mu\text{M}$	4.25 $\pm$ 0.54
EDTA 5 $\mu\text{M}$	4.70 $\pm$ 0.65
TbCl <sub>3</sub> + EDTA	4.65 $\pm$ 0.47
DEAE-dextrán 125 $\mu\text{g}$	1.65 $\pm$ 0.72
DEAE-dextrán + EDTA	4.20 $\pm$ 0.53

Las determinaciones se realizaron a temperatura ambiente , utilizando un conductímetro, cuya sonda estaba inmersa en una cubeta que contenía agua destilada hasta un volumen de 2.0 ml.

TABLA 2. Determinación de la permeabilización de las células por la medida del material que absorbe a 260 nm

TRATAMIENTO	$A_{260\text{nm}}$
NINGUNO	0.04 $\pm$ 0.01
DHS 100 $\mu\text{M}$	0.135 $\pm$ 0.015
DEAE-dextrán 300 $\mu\text{g}$	0.41 $\pm$ 0.073
TbCl <sub>3</sub> 20 $\mu\text{M}$	0.025 $\pm$ 0.003
CTAB 200 $\mu\text{M}$	0.58 $\pm$ 0.063

Se utilizaron 25 mg de células colectadas en fase estacionaria, ayunadas y lavadas dos veces con agua destilada; se les resuspendió en 10 ml de Buffer MES-TEA 2 mM pH 6, glucosa 10mM , y se incubaron con los compuestos y a las concentraciones que se indican durante 5 minutos. Al finalizar el tratamiento, las células se centrifugaron y filtraron en filtros con un tamaño de poro de 0.45 $\mu\text{m}$ . Utilizando el filtrado para las determinaciones de absorbencia.

Tabla 3. Salida de  $K^+$ , liberación de  $Ca^{2+}$  y carga de superficie de las levaduras ante los distintos agentes catiónicos.

	Salida de $K^+$ , $\mu M$		Liberación de	Carga sup. Compuesto
	Glucosa	G + EDTA	$Ca^{++}$ , $\mu M$	( $ID_{50}$ ), $\mu M$
DHS 50 $\mu M$	$30 \pm 2.5$	$80 \pm 10.4$	$7 \pm 0.9$	$5 \pm 2.3$
EB, 10 $\mu M$	$25 \pm 3.2$	$55 \pm 6.6$	N. D.	N. D.
TbCl <sub>3</sub> , 20 $\mu M$	$30 \pm 3.9$	$40 \pm 4.8$	$7 \pm 1.1$	$10 \pm 6.1$
DEAE-D, 50 $\mu g$	$50 \pm 7.3$	$60 \pm 8.3$	Sin ef.	$300 \pm 56 \mu g/ml$

Las determinaciones de la salida de  $K^+$ , en presencia o ausencia de EDTA, y las de  $Ca^{2+}$  se realizaron con electrodos específicos de  $K^+$  y  $Ca^{2+}$ , respectivamente. La carga de superficie se determinó midiendo la fluorescencia residual de la 9-aminoacridina, después de incubar las células con ella. En todos los casos se utilizaron 25 mg de células frescas, 2 mM de Buffer MES-TEA pH 6, 10 mM de glucosa. Donde se indica se utilizó 100  $\mu M$  de EDTA y 4  $\mu M$  de 9-aminoacridina. El volumen final de la suspensión para las determinaciones de  $K^+$  y  $Ca^{2+}$  fue de 10 ml. Los valores de la carga de superficie se dan como la concentración de cada uno de los agentes utilizados que produjo la liberación de la mitad de la 9-aminoacridina fija a las células.

TABLA 4. Porcentajes máximos de salida de  $^{86}Rb$  obtenidos por la incubación de las levaduras con compuestos catiónicos.

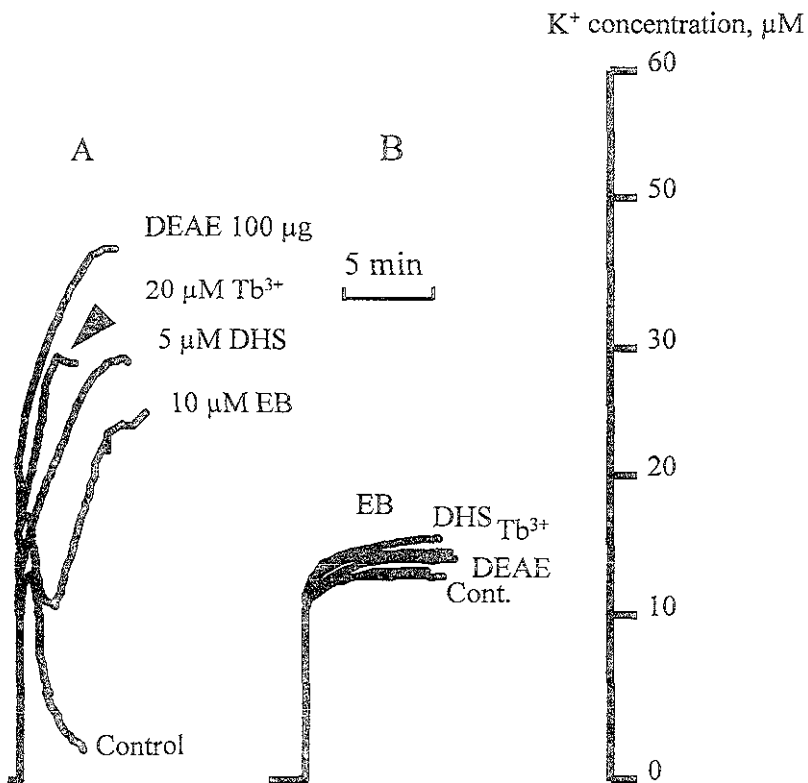
EB 50 $\mu M$	$30 \pm 5.6 \%$
TbCl <sub>3</sub> 50 $\mu M$	$1.2 \pm 0.3 \%$
DEAE-D 50 $\mu g$	$3.5 \pm 0.7 \%$
DHS 50 $\mu M$	$2.2 \pm 0.9 \%$

Se utilizaron 6g al 10% de células cosechadas en fase estacionaria, las cuales se incubaron con  $^{86}Rb$  (100 mM, 3,000,000 dpm), y glucosa 10 mM durante 24 horas. Al cabo de este tiempo se lavaron y se utilizaron 50 mg de células para medir la salida de  $^{86}Rb$  en presencia de diferentes concentraciones de cada uno de los compuestos catiónicos correspondientes. Las determinaciones se hicieron por diferencia después de filtrar las células en un multifiltro con membranas de 0.45 $\mu m$ .

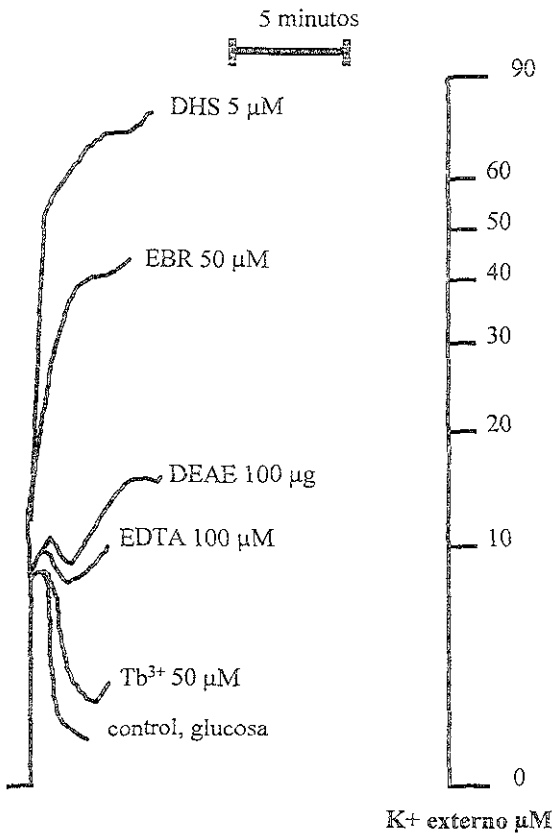
TABLA 5. Determinación de las constantes cinéticas para el transporte de  $^{86}\text{Rb}^+$  en presencia de los compuestos catiónicos.

COMPUESTO	CONSTANTES	
	$V_{\text{máx}}$ (nmoles/mg lev min)	$K_m$ (mM)
Control	$18.3 \pm 3.2$	$0.8 \pm 0.32$
50 $\mu\text{M}$ DHS	$4.96 \pm 1.96$	$0.77 \pm 0.28$
50 $\mu\text{M}$ EB	$13.8 \pm 2.7$	$3.6 \pm 1.7$
50 $\mu\text{M}$ $\text{TbCl}_3$	$5.2 \pm 0.65$	$0.6 \pm 0.05$
DEAE-dextrán	$8.0 \pm 0.96$	$0.5 \pm 0.2$

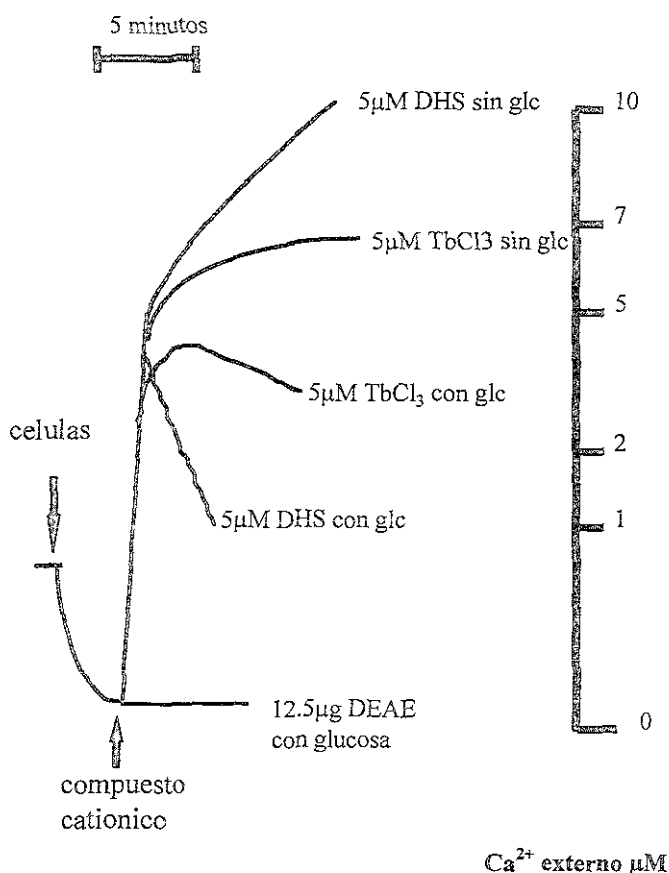
Las constantes cinéticas se calcularon a partir de las gráficas correspondientes de Lineweaver-Burk e Eadie-Hofstee. Se utilizaron 50 mg de células, amortiguador MES-TEA 5 mM pH 6, glucosa 50 mM. Las células se incubaron 2 minutos y al final de este periodo se pusieron en presencia de distintas concentraciones de  $^{86}\text{Rb}^+$  (de 50  $\mu\text{M}$  a 20 mM) y las concentraciones indicadas de los agentes catiónicos. Se retiraron alícuotas de 100  $\mu\text{l}$ , a los 15, 30 y 45 segundos y a 1, 2, 4 y 8 minutos las cuales se filtraron y se les determinó  $^{86}\text{Rb}^+$ .



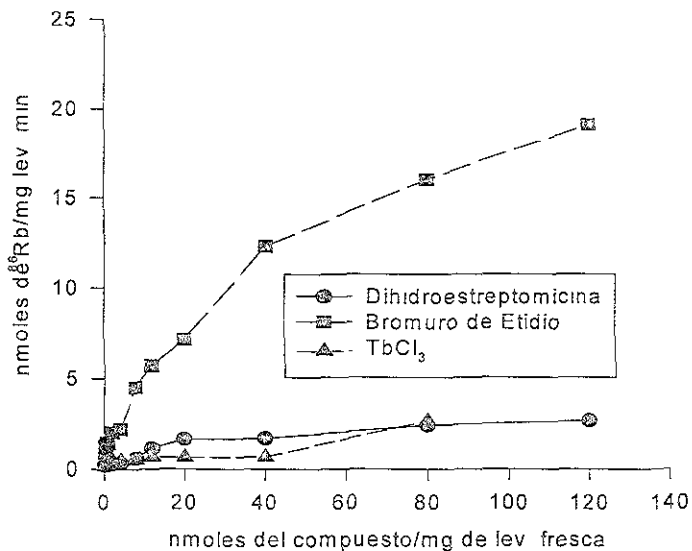
**FIGURA 1. SALIDA DE POTASIO PRODUCIDA POR DIFERENTES AGENTES CATIONICOS; REQUERIMIENTO DE GLUCOSA.** Condiciones de incubación: amortiguador MES-TEA 2 mM pH 6.0 y donde se señala en cada trazo, la concentración correspondiente del compuesto catiónico. Volumen final 10 ml. El registro de la concentración externa de potasio se inició después de agregar 25 mg de levaduras frescas. Para realizar las determinaciones se utilizó un electrodo específico de potasio. En A todos los trazos se realizaron en presencia de glucosa 10 mM y en B en su ausencia.



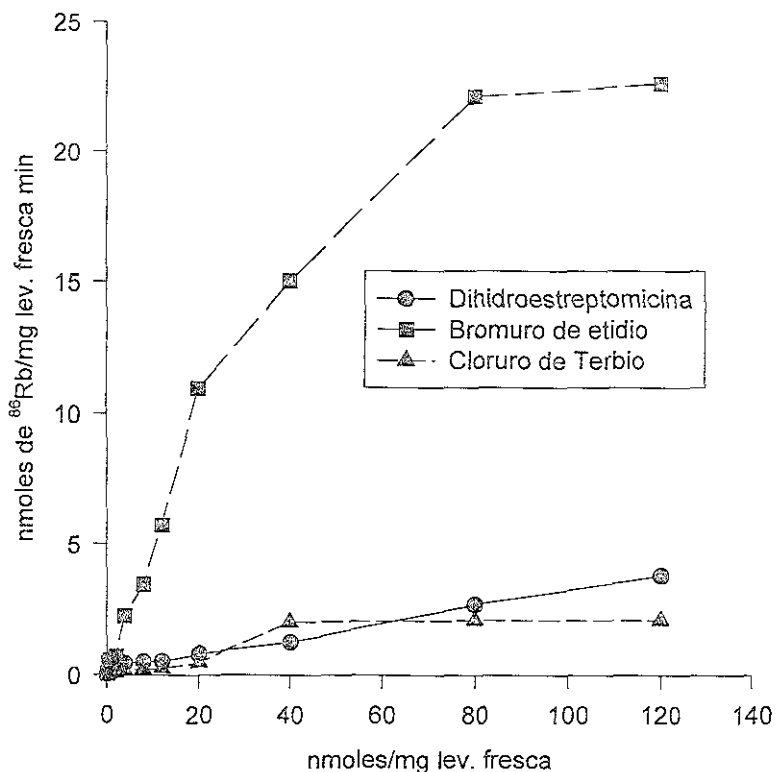
**FIGURA 2. SALIDA DE POTASIO INDUCIDA POR DIFERENTES AGENTES CATIONICOS EN PRESENCIA DE EDTA 100  $\mu\text{M}$ .** Condiciones de incubación: amortiguador MES-TEA 2 mM pH 6.0, glucosa 10 mM, EDTA 100  $\mu\text{M}$  (excepto en el registro control) y donde se señala en cada trazo, la concentración correspondiente del compuesto catiónico. Volumen final 10 ml. El registro de la concentración externa de potasio se inició después de agregar 25 mg de levaduras frescas. Para realizar las determinaciones se utilizó un electrodo específico de potasio.



**FIGURA 3. CAMBIOS EN EL CALCIO EXTERNO INDUCIDOS POR DIFERENTES AGENTES CATIONICOS.** Condiciones de incubación: amortiguador MES-TEA 2 mM pH 6.0, glucosa 10mM (donde se señala) y las concentraciones correspondientes de cada compuesto catiónico..Volúmen final 10 ml. El experimento se inició al agregar 25 mg de levaduras al medio de incubación y se empezaron a registrar los cambios en el calcio externo, posteriormente se agregaron los compuestos catiónicos correspondientes. La concentración externa de calcio se determinó utilizando un electrodo específico de calcio. El control sin glucosa y células, así como el control con células y glucosa coinciden con el trazo de 12.5 μg de DEAE-D con glucosa por esta razón no se incluyeron.

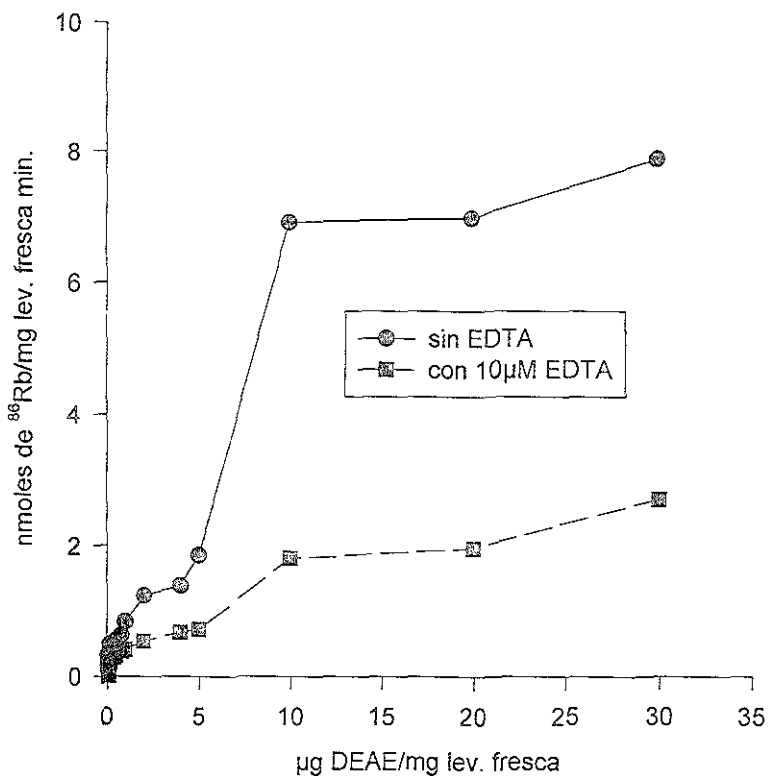


**FIGURA 4. SALIDA DE  $^{86}\text{Rb}$  INDUCIDO POR DIFERENTES COMPUESTOS CATIONICOS.** 50 mg de células previamente cargadas con  $^{86}\text{Rb}$  se incubaron en 5mM de MES-TEA pH 6.0 y glucosa 50 mM con diferentes concentraciones de cada uno de los compuestos cationicos. A diferentes tiempos (15,30,45 seg y 1,2,5,10,20,30min.) se retiraron alícuotas de 100  $\mu\text{l}$  que se filtraron, lavaron con KCl y se contaron en un contador de centelleo.

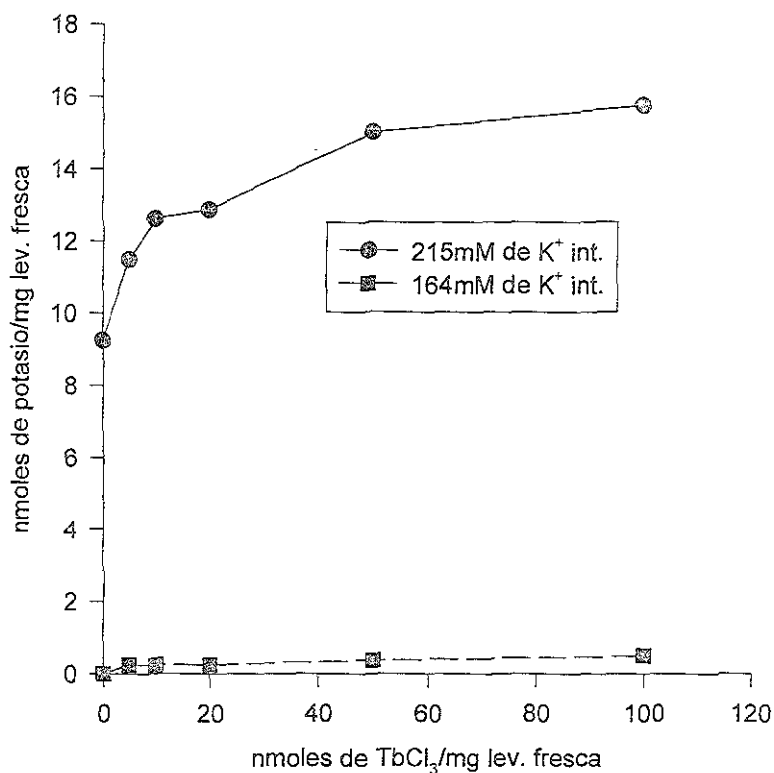


**FIGURA 5. SALIDA DE  $^{86}\text{Rb}$  INDUCIDA POR DIFERENTES COMPUESTOS CATIONICOS EN PRESENCIA DE EDTA  $10\mu\text{M}$ .** 50 mg de células previamente cargadas con  $^{86}\text{Rb}$  se incubaron en 5mM de MES-TEA pH 6.0, EDTA  $10\mu\text{M}$  y glucosa 50 mM con diferentes concentraciones de cada uno de los compuestos catiónicos. A diferentes tiempos (15,30,45 seg y 1,2,5,10,20,30min.) se retiraron alícuotas de  $100\mu\text{l}$  que se filtraron, lavaron con KCl y se contaron en un contador de centelleo.

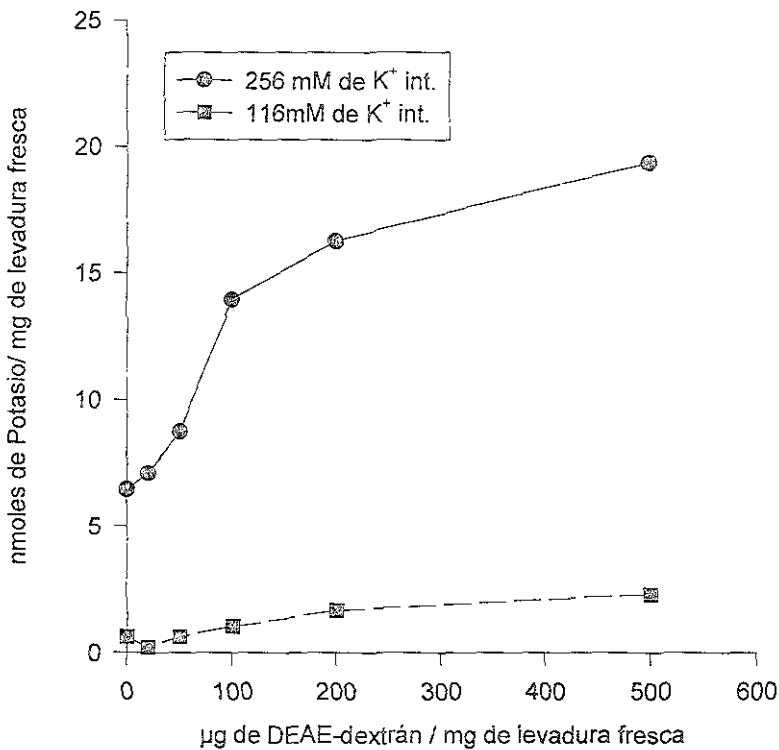




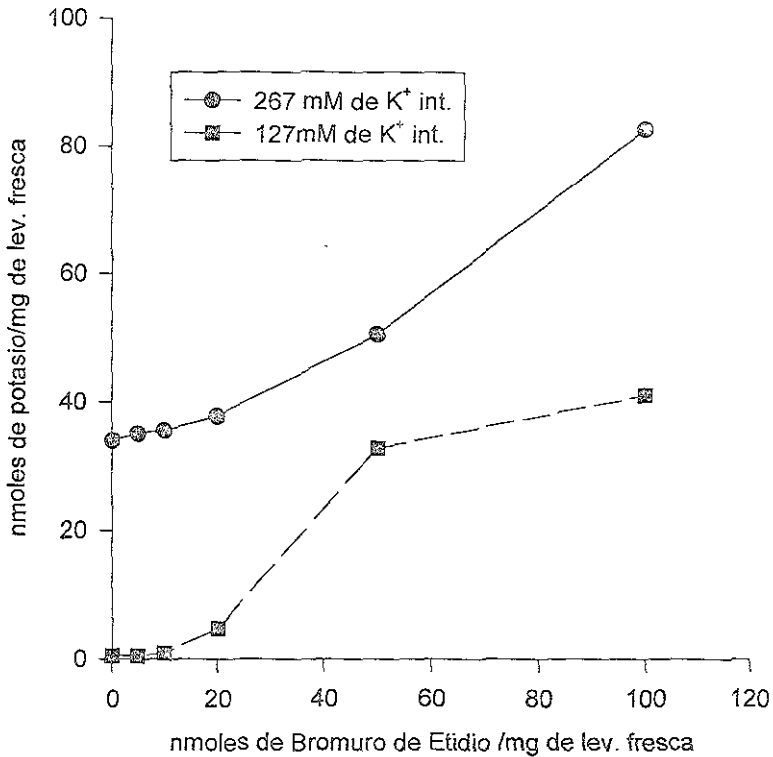
**FIGURA 6. SALIDA DE <sup>86</sup>Rb INDUCIDA POR DEAE-D EN PRESENCIA O AUSENCIA DE EDTA 10 µM.** 50 mg de células previamente cargadas con <sup>86</sup>Rb se incubaron en 5mM de MES-TEA pH 6.0, glucosa 50 mM con y sin EDTA 10 µM y diferentes concentraciones de cada uno de los compuestos catiónicos. A diferentes tiempos (15,30,45 seg y 1,2,5,10,20,30min.) se retiraron alícuotas de 100 µl que se filtraron, lavaron con KCl y se contaron en un contador de centelleo.



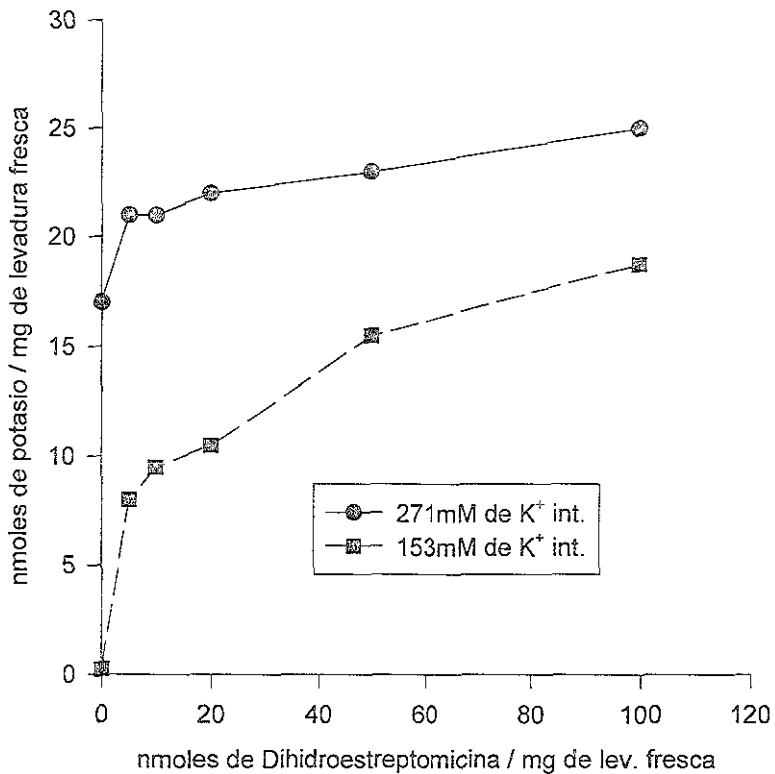
**FIGURA 7.- SALIDA DE POTASIO INDUCIDA POR TERBIO A DOS DIFERENTES CONCENTRACIONES DE POTASIO INTERNO.** 50 mg de levaduras frescas fueron lavadas dos o mas veces con agua destilada con el fin de disminuir la concentración de potasio interno. Otros 50 mg de levaduras se utilizaron sin este tratamiento después de ayunarlas. Ambas células se trataron con diferentes concentraciones de cloruro de terbio en un medio de incubación con 2mM de MES-TEA pH 6.0, glucosa 10mM y se incubaron por 5 minutos. Al cabo de este tiempo, se centrifugaron y el sobrenadante se recolectó para determinar el potasio externo en un flamómetro.



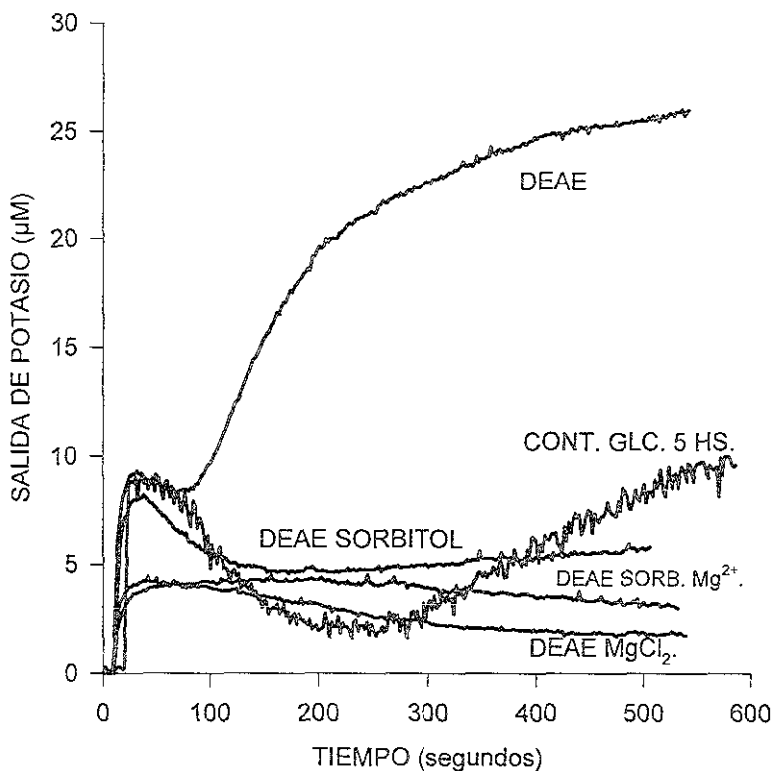
**FIGURA 8.- SALIDA DE POTASIO INDUCIDA POR EL TRATAMIENTO CON DEAE-D A DOS DIFERENTES CONCENTRACIONES DE POTASIO INTERNO.** 50 mg de levaduras frescas fueron lavadas dos o mas veces con agua destilada con el fin de disminuir la concentración de potasio interno. Otros 50 mg de levaduras se utilizaron sin este tratamiento después de ayunarlas. Ambas células se trataron con diferentes concentraciones de DEAE-D en un medio de incubación con 2mM de MES-TEA pH 6.0, glucosa 10mM y se incubaron por 5 minutos. Al cabo de este tiempo, se centrifugaron y el sobrenadante se recolectó para determinar el potasio externo en un flamómetro.



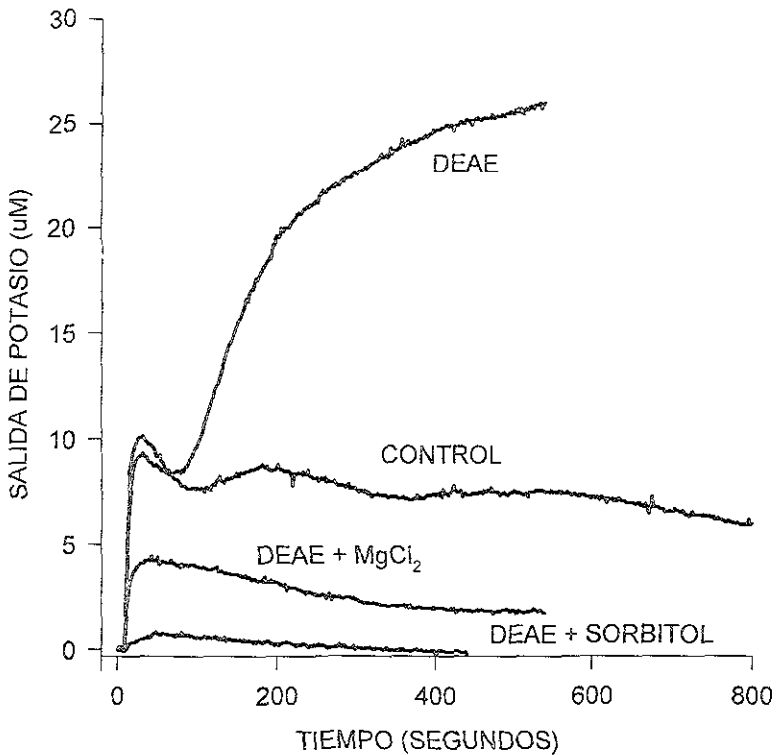
**FIGURA 9.- SALIDA DE POTASIO INDUCIDA POR EL TRATAMIENTO CON BROMURO DE ETIDIO A DOS DIFERENTES CONCENTRACIONES DE POTASIO INTERNO.** 50 mg de levaduras frescas fueron lavadas dos o mas veces con agua destilada con el fin de disminuir la concentración de potasio interno. Otros 50 mg de levaduras se utilizaron sin este tratamiento después de ayunarlas. Ambas células se trataron con diferentes concentraciones de Bromuro de etidio en un medio de incubación con 2mM de MES-TEA pH 6.0, glucosa 10mM y se incubaron por 5 minutos. Al cabo de este tiempo, se centrifugaron y el sobrenadante se recolectó para determinar el potasio externo en un flamómetro.



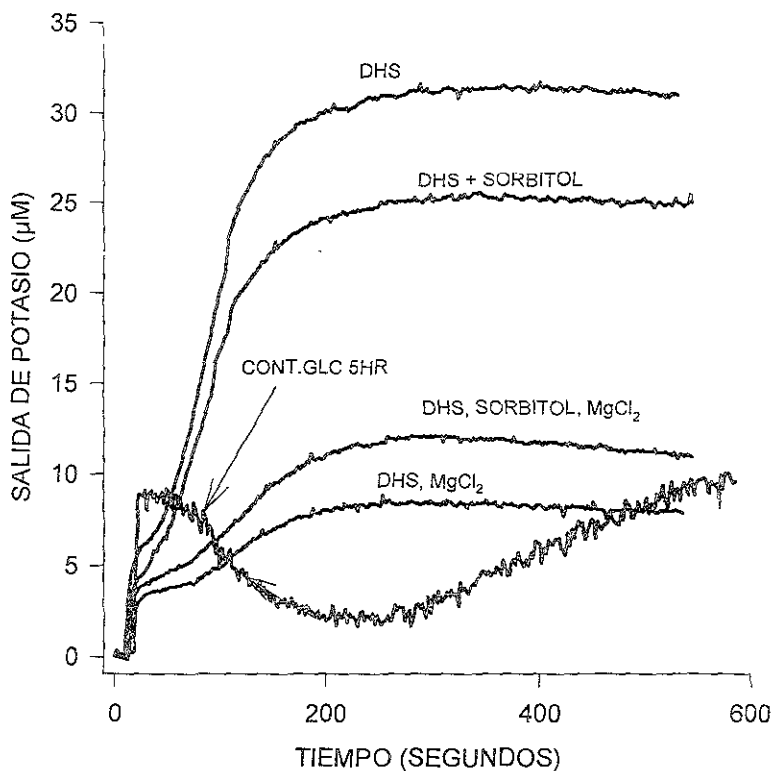
**FIGURA 10.- SALIDA DE POTASIO INDUCIDA POR EL TRATAMIENTO CON DHS A DOS DIFERENTES CONCENTRACIONES DE POTASIO INTERNO.** 50 mg de levaduras frescas fueron lavadas dos o mas veces con agua destilada con el fin de disminuir la concentración de potasio interno. Otros 50 mg de levaduras se utilizaron sin este tratamiento después de ayunarlas. Ambas células se trataron con diferentes concentraciones de DHS en un medio de incubación con 2mM de MES-TEA pH 6.0, glucosa 10mM y se incubaron por 5 minutos. Al cabo de este tiempo, se centrifugaron y el sobrenadante se recolectó para determinar el potasio externo en un flamómetro.



**FIGURA 11.- SALIDA DE POTASIO INDUCIDA POR DEAE-D. EFECTO DEL SORBITOL Y CLORURO DE MAGNESIO EN CELULAS AYUNADAS 5 HORAS.** Condiciones de incubación: MES-TEA pH 6.0 2 mM, glucosa 10 mM. Donde se indica se agregó sorbitol 0.8 M y MgCl<sub>2</sub> 1 mM. Volúmen final 10 ml. Después de unos segundos de incubación con 50 µg de DEAE-D, se agregaron 25 mg de levaduras frescas, ayunadas por 5 horas, registrando continuamente la concentración externa de potasio por medio de un electrodo específico de potasio.

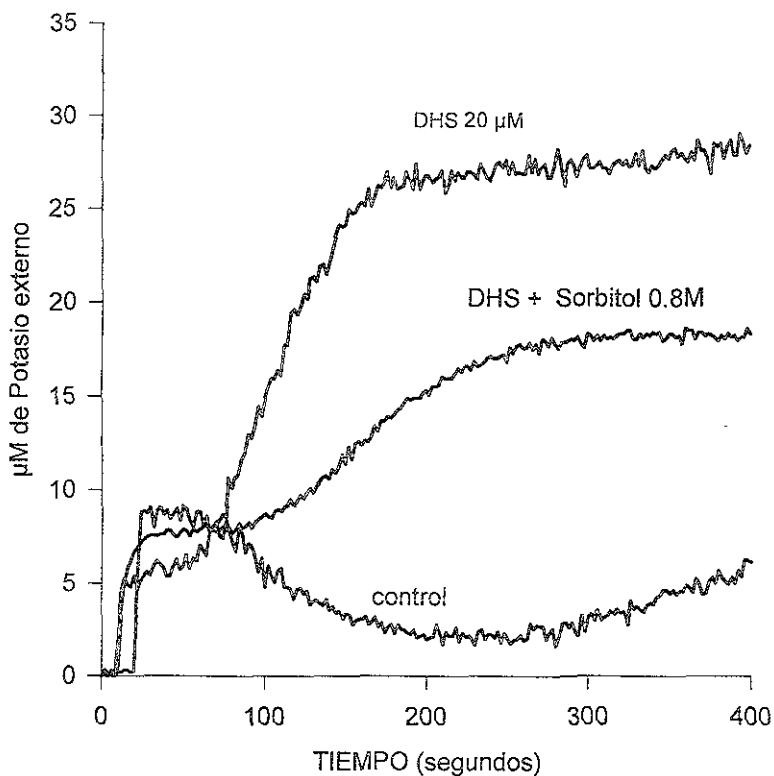


**FIGURA 12.- SALIDA DE POTASIO INDUCIDA POR DEAE-D. EFECTO DEL SORBITOL Y CLORURO DE MAGNESIO EN CELULAS AYUNADAS 15 HORAS.** Condiciones de incubación: MES-TEA pH 6.0 2 mM, glucosa 10 mM. Donde se indica se agregó sorbitol 0.8 M y MgCl<sub>2</sub> 1mM. Volúmen final 10 ml. Después de unos segundos de incubación con 50 µg de DEAE-D, se agregaron 25 mg de levaduras frescas, ayunadas por 15 horas, registrando continuamente la concentración externa de potasio por medio de un electrodo específico de potasio.

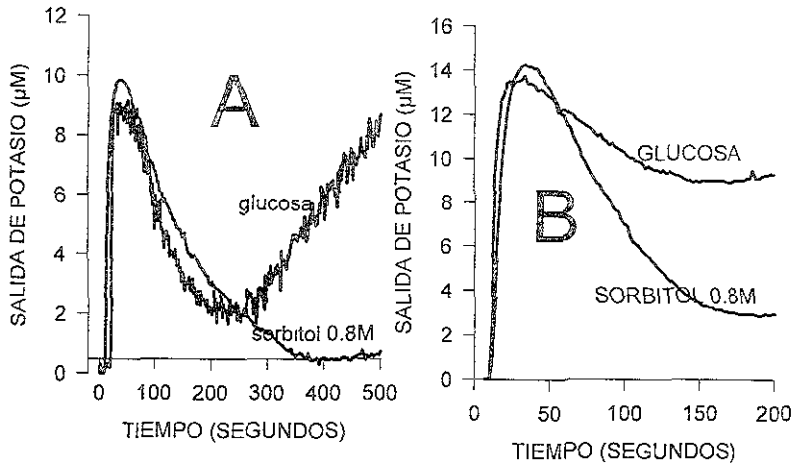


**FIGURA 13.- SALIDA DE POTASIO INDUCIDA POR DHS. EFECTO DEL SORBITOL Y EL CLORURO DE MAGNESIO EN CELULAS AYUNADAS 5 HORAS.** Condiciones de incubación: MES-TEA pH 6.0 2 mM, glucosa 10 mM. Donde se indica se agregó sorbitol 0.8 M y MgCl<sub>2</sub> 1mM. Volúmen final 10 ml. Después de unos segundos de incubación con 20 μM de DHS, se agregaron 25 mg de levaduras frescas, ayunadas por 5 horas, registrando continuamente la concentración externa de potasio por medio de un electrodo específico de potasio.

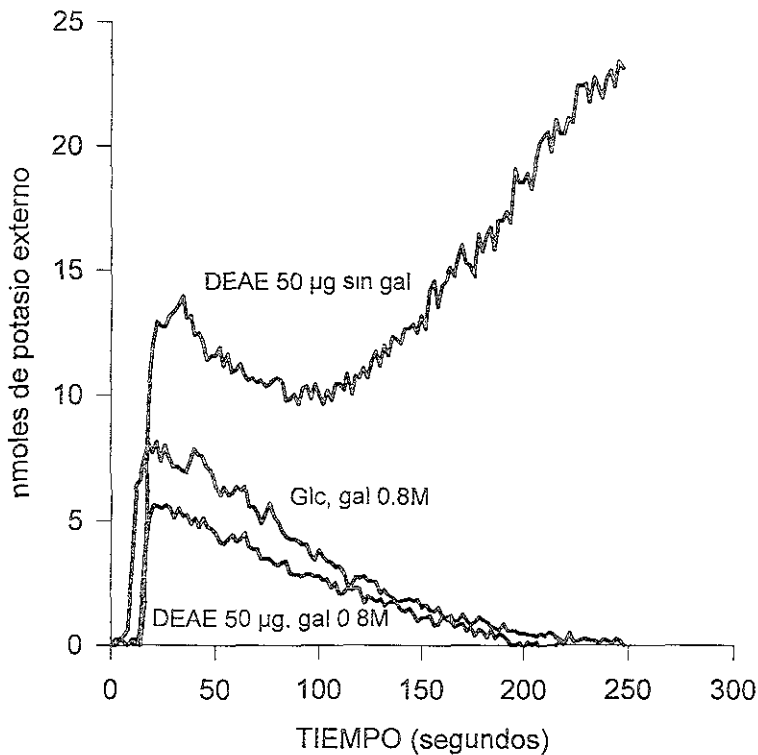




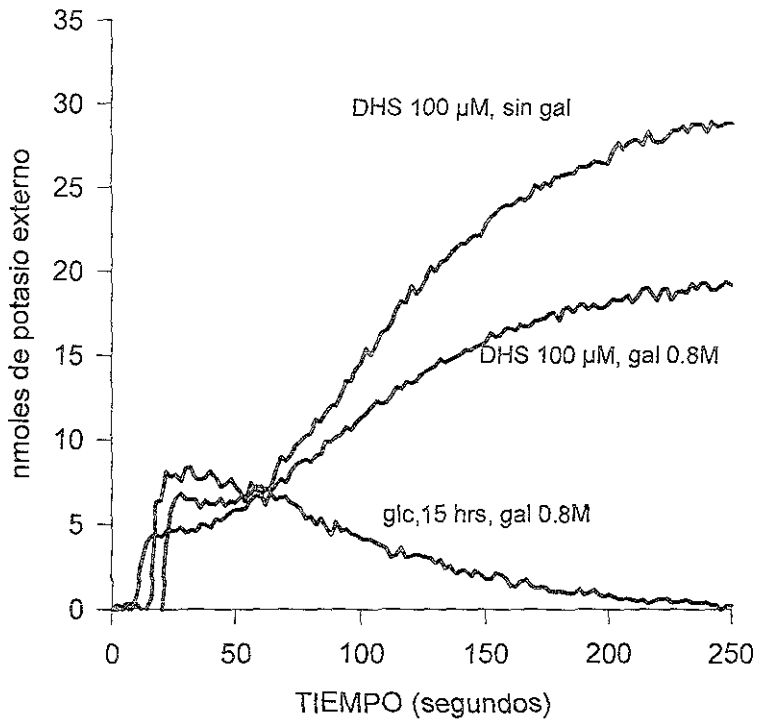
**FIGURA 14.- SALIDA DE POTASIO INDUCIDA POR DHS. EFECTO DEL SORBITOL EN CELULAS AYUNADAS 15 HORAS.** Condiciones de incubación: MES-TEA pH 6.0 2 mM, glucosa 10 mM. Donde se indica se agregó sorbitol 0.8 M. Volúmen final 10 ml. Después de unos segundos de incubación con 20 µM de DHS, se agregaron 25 mg de levaduras frescas, ayunadas por 15 horas, registrando continuamente la concentración externa de potasio por medio de un electrodo específico de potasio.



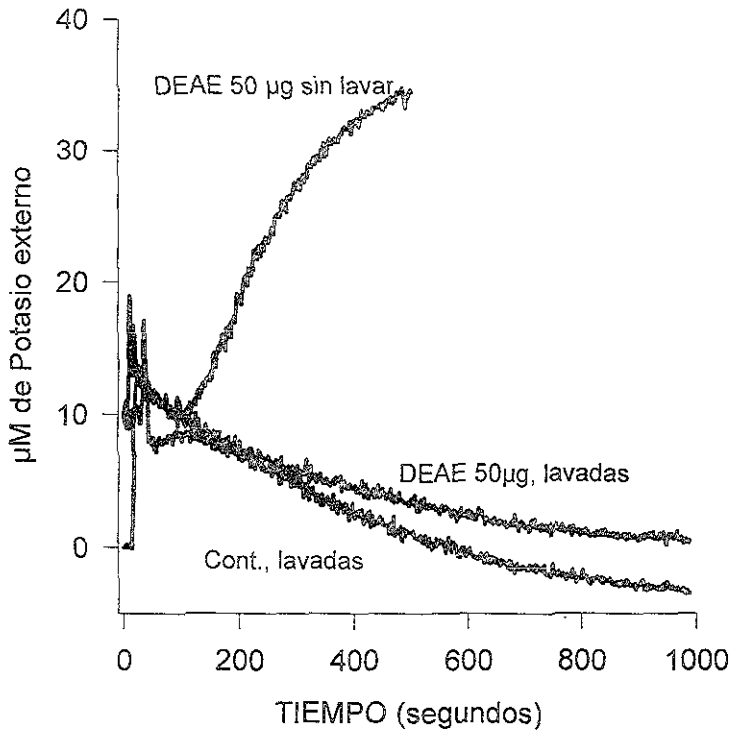
**FIGURA 15.- EFECTO DEL SORBITOL SOBRE EL CONTROL DE GLUCOSA EN CELULAS AYUNADAS 5 Y 15 HORAS.** Condiciones de incubación: MES-TEA pH 6.0 2 mM, sorbitol 0.8 M y donde se indica glucosa 10 mM. Volúmen final 10 ml. Después de unos segundos se agregaron 25 mg de levaduras frescas, ayunadas por 5 (figura 15A) y 15 horas (figura 15B), registrando continuamente la concentración externa de potasio por medio de un electrodo específico de potasio.



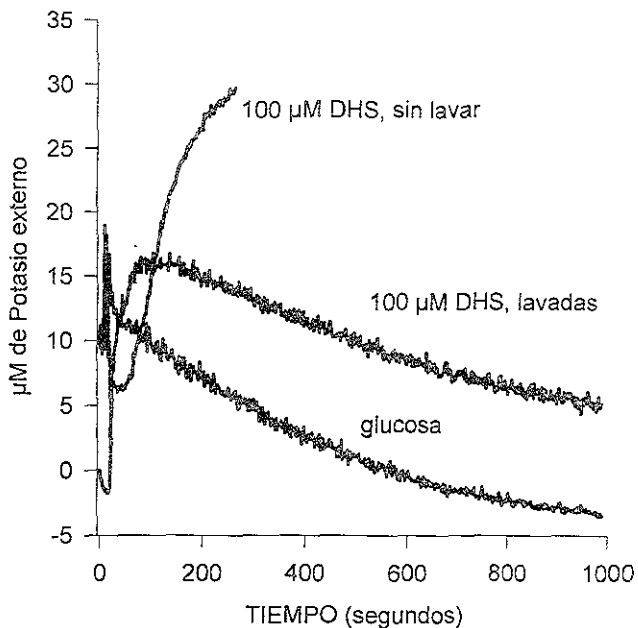
**FIGURA 16.- SALIDA DE POTASIO INDUCIDA POR DEAE-D. EFECTO DE LA GALACTOSA EN CELULAS AYUNADAS 15 HORAS.** Condiciones de incubación: MES-TEA 2 mM pH 6.0, glucosa 10 mM. Donde se indica se agregó galactosa 0.8 M. Volúmen final 10 ml. Después de unos segundos de incubación con 50 µg de DEAE-D, se agregaron 25 mg de levaduras frescas, ayunadas por 15 horas, registrando continuamente la concentración externa de potasio por medio de un electrodo específico de potasio.



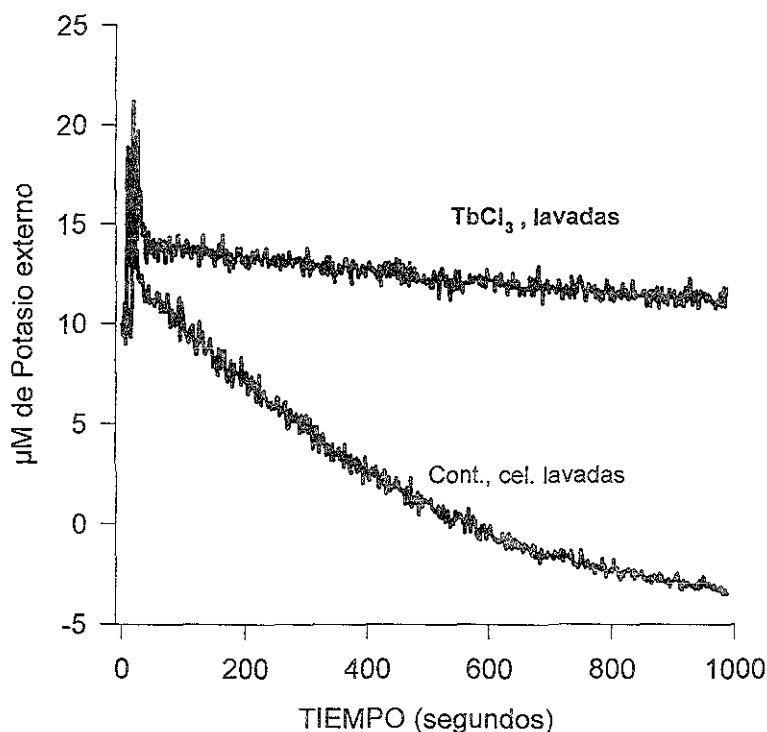
**FIGURA 17.- SALIDA DE POTASIO INDUCIDA POR DHS. EFECTO DE LA GALACTOSA EN CELULAS AYUNADAS 15 HORAS.** Condiciones de incubación: MES-TEA pH 6.0 2 mM, glucosa 10 mM. Donde se indica se agregó galactosa 0.8 M. Volúmen final 10 ml. Después de unos segundos de incubación con 100  $\mu$ M de DHS, se agregaron 25 mg de levaduras frescas, ayunadas por 15 horas, registrando continuamente la concentración externa de potasio por medio de un electrodo específico de potasio.



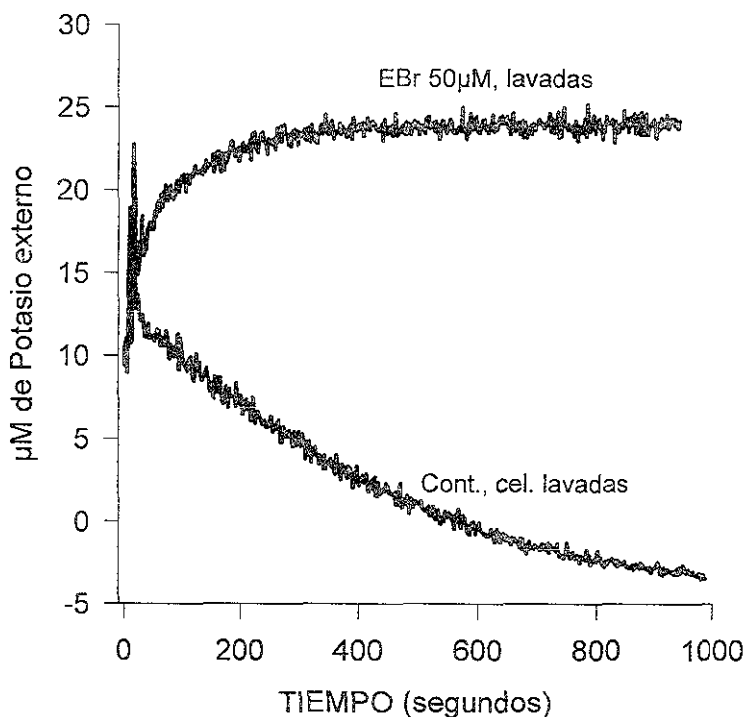
**FIGURA 18.- REMOCION DEL DEAE-D POR LAVADO CON CLORURO DE MAGNESIO.** 50 mg de levaduras se pusieron a incubar por 5 minutos con 50 µg de DEAE-D en 10 ml del siguiente medio: 2 mM de MES-TEA pH 6, 10 mM de glucosa. Las levaduras se centrifugaron y se lavaron dos veces con 1mM de cloruro de magnesio. La células lavadas se recuperaron y se resuspendieron en 10 ml del medio de incubación mas 10 µM de KCl para medir los cambios de concentracion externos de potasio con un electrodo específico de potasio.



**FIGURA 19.- REMOCION DE DHS POR LAVADO CON CLORURO DE MAGNESIO.** 50 mg de levaduras se pusieron a incubar por 5 minutos con 100 µM de DHS en 10 ml del siguiente medio: 2 mM de MES-TEA pH6, 10 mM de glucosa. Las levaduras se centrifugaron y se lavaron dos veces con 1mM de cloruro de magnesio. La células lavadas se recuperaron y se resuspendieron en 10 ml del medio de incubación mas 10 µM de KCl para medir los cambios de concentración externos de potasio con un electrodo específico de potasio.

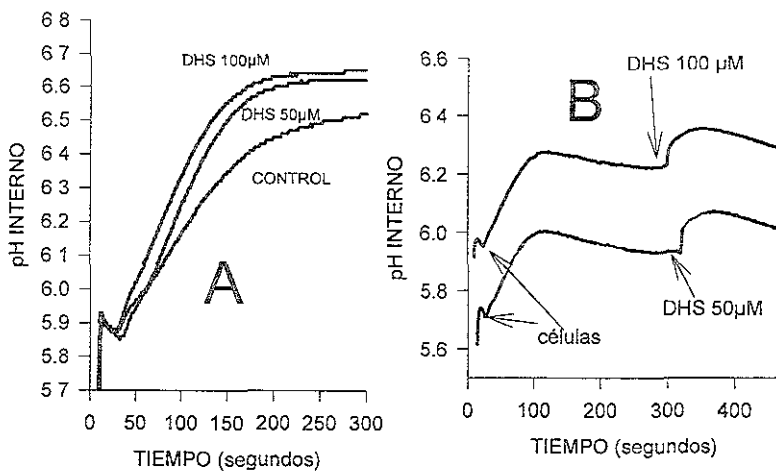


**FIGURA 20.- REMOCION DEL CLORURO DE TERBIO POR LAVADO CON CLORURO DE MAGNESIO.** 50 mg de levaduras se pusieron a incubar por 5 minutos con 20 µM de TbCl<sub>3</sub> en 10 ml del siguiente medio: 2 mM de MES-TEA pH6, 10 mM de glucosa. Las levaduras se centrifugaron y se lavaron dos veces con 1mM de cloruro de magnesio. La células lavadas se recuperaron y se resuspendieron en 10 ml del medio de incubación mas 10 µM de KCl para medir los cambios de concentración externos de potasio con un electrodo específico de potasio. Nota: no se incluye el control de terbio sin lavar porque interfiere con el electrodo, para ello referirse a la figura 1.

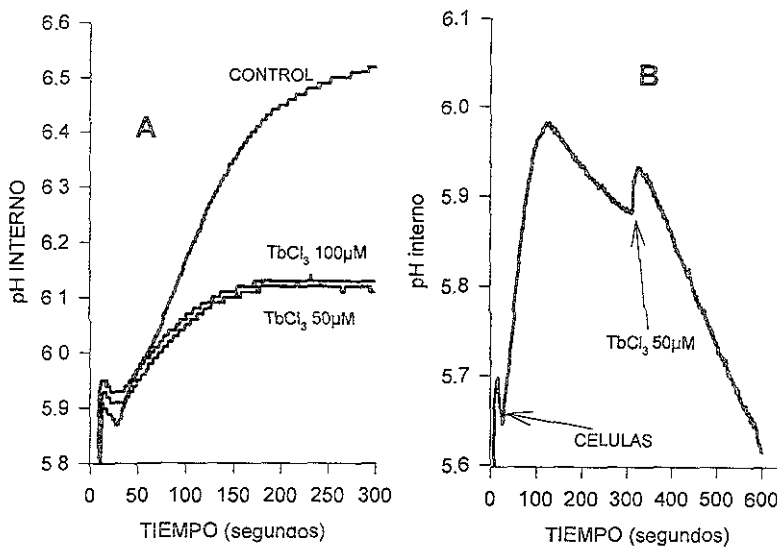


**FIGURA 21.- REMOCION DEL BROMURO DE ETIDIO POR LAVADOS CON CLORURO DE MAGNESIO.** 50 mg de levaduras se pusieron a incubar por 5 minutos con 50  $\mu\text{M}$  de Bromuro de etidio en 10 ml del siguiente medio: 2 mM de MES-TEA pH6, 10 mM de glucosa. Las levaduras se centrifugaron y se lavaron dos veces con 1mM de cloruro de magnesio. La células lavadas se recuperaron y se resuspendieron en 10 ml del medio de incubación mas 10  $\mu\text{M}$  de KCl para medir los cambios de concentración externos de potasio con un electrodo específico de potasio. Nota: no se incluye el control sin lavar y tratado con bromuro de etidio porque interfiere con el electrodo, para ello dirigirse a la figura 1.

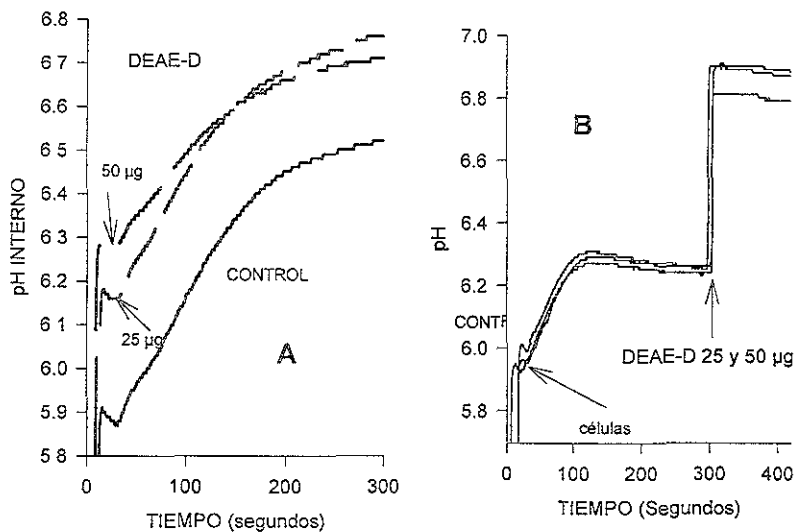




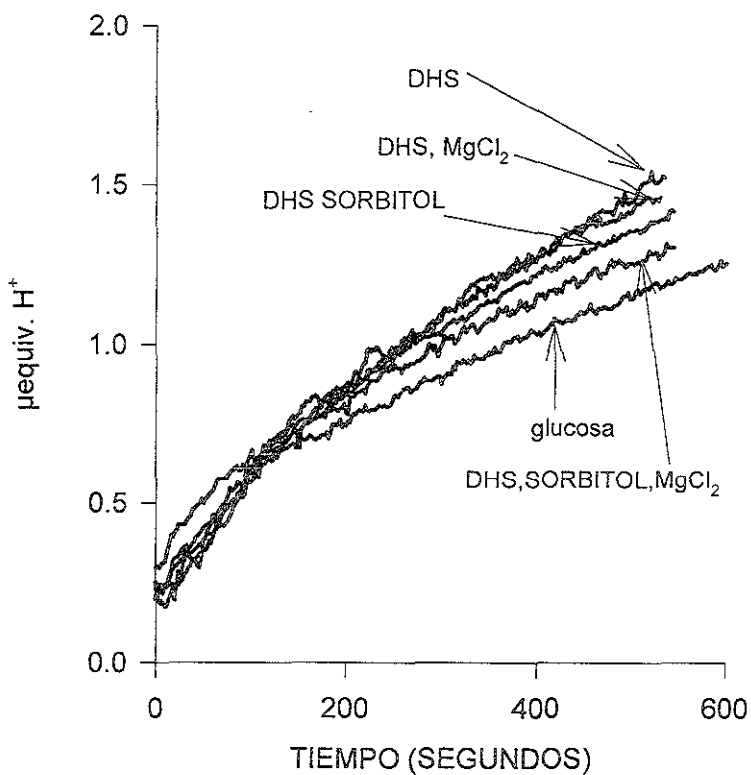
**FIGURA 22.- EFECTO DE LA DHS SOBRE EL pH INTERNO DE LA LEVADURA.** 25 mg de células previamente electroporadas con 2.8 mM de piranina se utilizaron para el ensayo de medición del pH interno de la levadura, estas células se depositaron en un medio que contenía glucosa 10 mM, MES-TEA 2 mM pH 6.0. En los trazos A, se agregó 50 o 100 µM de DHS junto con el medio y se inició el registro en el momento de agregar las levaduras. En los trazos B, el medio no contenía la DHS y se inició el registro del pH al agregar las células y una vez iniciado el trazo se agregaron 50 o 100 µM de DHS a los tiempos indicados en la gráfica.



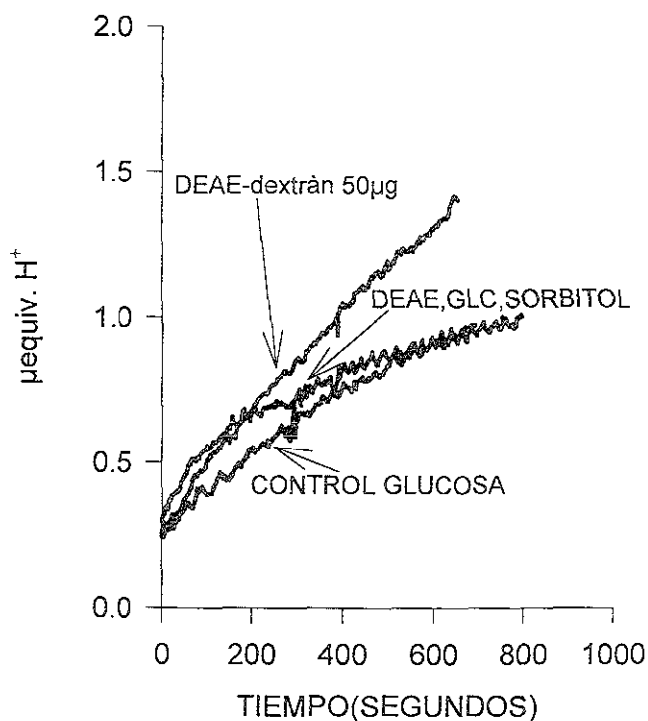
**FIGURA 23.- EFECTO DEL CLORURO DE TERBIO SOBRE EL pH INTERNO DE LA LEVADURA.** 25 mg de células previamente electroporadas con 2.8 mM de piranina se utilizaron para el ensayo de medición del pH interno de la levadura, estas células se depositaron en un medio que contenía glucosa 10 mM, MES-TEA 2 mM pH 6.0. En los trazos A, se agregó 50 o 100  $\mu$ M de cloruro de terbio junto con el medio y se inició el registro en el momento de agregar las levaduras. En los trazos B, el medio no contenía el cloruro de terbio y se inició el registro del pH al agregar las células y una vez iniciado el trazo se agregaron 50 o 100  $\mu$ M de Cloruro de terbio a los tiempos indicados en la gráfica.



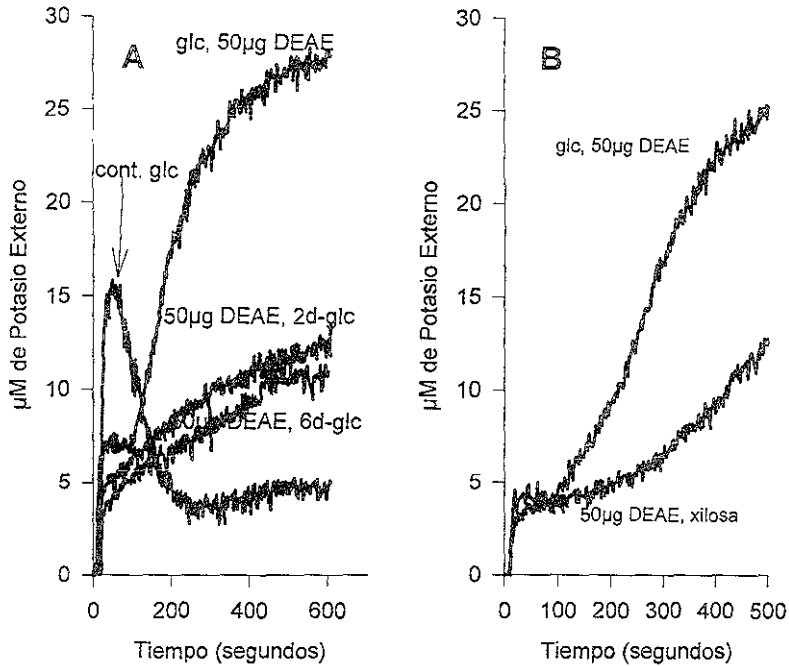
**FIGURA 24.- EFECTO DEL DEAE-D SOBRE EL pH INTERNO DE LA LEVADURA.** 25 mg de células previamente electroporadas con 2.8 mM de piranina se utilizaron para el ensayo de medición del pH interno de la levadura, estas células se depositaron en un medio que contenía glucosa 10 mM, MES-TEA 2 mM pH 6.0. En los trazos A, se agregó 25 o 50 µg DEAE-D junto con el medio y se inició el registro en el momento de agregar las levaduras. En los trazos B, el medio no contenía el DEAE-D y se inició el registro del pH al agregar las células y una vez iniciado el trazo se agregaron 25 o 50 µg de DEAE-D a los tiempos indicados en la gráfica.



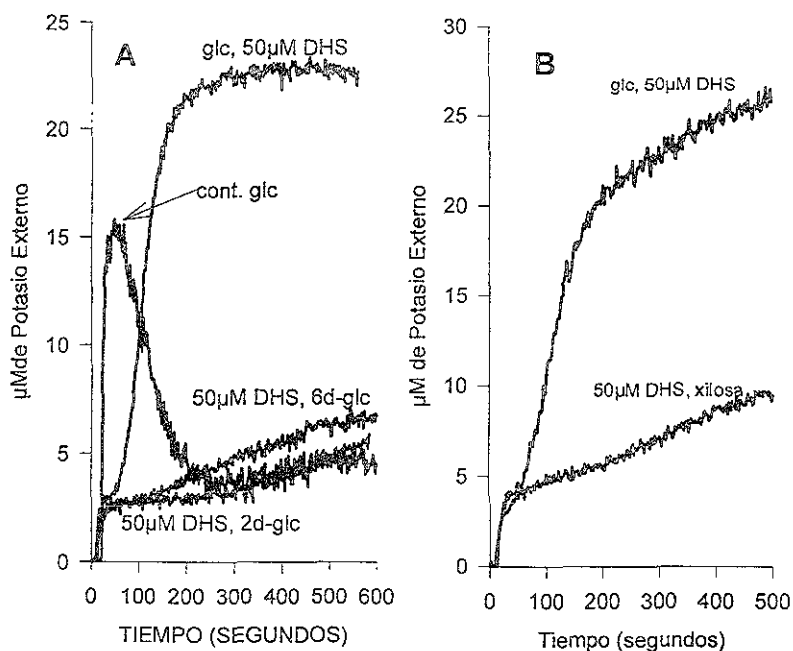
**FIGURA 25.- EFECTO DE LA DHS SOBRE LA ACTIVIDAD DE BOMBA DE PROTONES.** La concentración de protones se determinó continuamente con un electrodo de pH en un medio con 2 mM de MES-TEA pH 6.0 y 10 mM de glucosa utilizando 50 mg de levaduras. Otras condiciones se indican con flechas y corresponden a: 50  $\mu$ M de DHS, 0.8 M de sorbitol y/o 1 mM de cloruro de magnesio. El registro se inició al agregar las levaduras.



**FIGURA 26.- EFECTO DEL DEAE-D SOBRE LA ACTIVIDAD DE BOMBA DE PROTONES.** La concentración de protones se determinó continuamente con un electrodo de pH en un medio con 2 mM de MES-TEA pH 6.0 y 10 mM de glucosa utilizando 50 mg de levaduras. Donde se indica, se agregaron 50 µG de DEAE-D y/o 0.8 M de sorbitol.



**FIGURA 27.- SALIDA DE POTASIO INDUCIDA POR DEAE-D EN PRESENCIA DE OTROS CARBOHIDRATOS NO METABOLIZABLES.** La salida de potasio se determinó con un electrodo específico de potasio en un medio con 2 mM de MES-TEA pH 6.0 y glucosa 10 mM. Donde se indica, se agregó 50 µg de DEAE-D y se reemplazó la glucosa por 10 mM de 2-desoxiglucosa o 6-desoxiglucosa (trazos A); o bien por 10 mM de xilosa (trazos B).



**FIGURA 28.- SALIDA DE POTASIO INDUCIDA POR DHS EN PRESENCIA DE OTROS CARBOHIDRATOS NO METABOLIZABLES.** La salida de potasio se determinó con un electrodo específico de potasio en un medio con 2 mM de MES-TEA pH 6.0 y glucosa 10 mM. Donde se indica, se agregó 50 µm de DHS y se reemplazó la glucosa por 10mM de 2-desoxiglucosa o 6-desoxiglucosa (trazos A); o bien por 10 mM de xilosa (trazos B).

## VIII. DISCUSION.

### VIII.1. La carga de superficie y la salida de potasio de la levadura.

Parte de lo que pretendíamos averiguar en este trabajo era dónde se concentraban los compuestos catiónicos para producir su efecto. Los resultados de Peña y Ramírez (1975) mostraban que el EB se transportaba a través del acarreador de potasio y que probablemente requería concentrarse en el citoplasma para ejercer su efecto. En consecuencia, pudieron aislarse cepas resistentes a EB afectadas del transportador de potasio (Brunner et al, 1982).

Por otra parte, los resultados de Peña y Ramírez (1991) mostraban diferencias en la magnitud de salida de potasio que diferentes agentes catiónicos promovían. La explicación que dieron a este hecho fue que la composición de ambos medios era la causa de tal divergencia. Es decir, sale más potasio por efecto del tratamiento con los cationes cuando se usan levaduras crecidas en medio YPD, que las crecidas en medio de De Kloet.

Dado que este último medio tiene un mayor contenido de sales que el medio de YPD, se infirió que presentaba una menor carga de superficie para la unión de los compuestos catiónicos y que la carga negativa de la superficie era importante para que se presentara el fenómeno. De hecho nuestras determinaciones de carga de superficie, usando como sonda la 9-aminoacridina, indican que las células crecidas en YPD tienen  $2.7 \pm 0.4$  veces más carga de superficie que las células crecidas en medio de Klöet.

En este mismo sentido, en la literatura está reportado por Elferink y Booij (1975), que el EDTA aumenta el efecto promovido por los colorantes catiónicos, aparentemente porque aumenta la carga de superficie.

Nuestros experimentos mostraron que la unión de los compuestos catiónicos utilizados a las cargas negativas de la superficie era un requisito para que el fenómeno de salida de potasio se presentara. Esto a juzgar por la inhibición que se obtuvo de la salida de potasio en presencia del agente catiónico y el ion  $Mg^{2+}$ , que compite por las cargas negativas.

Sin embargo, el incremento de la carga de superficie por el tratamiento con el EDTA no resultó en una mayor salida de potasio para todos los cationes usados; es decir, la salida de potasio promovida por los compuestos catiónicos no se explica solamente por el



enmascaramiento de las cargas negativas de la superficie de la célula. En este punto, aunque la DHS y EB mostraron un mayor efecto, el  $TbCl_3$  y el DEAE-D mostraron inhibición de la salida de potasio en presencia del EDTA. El primer caso se explicó por la formación de un complejo entre el  $Tb^{3+}$  y el EDTA, pero no así para el DEAE-D. Este último caso, parece estar más relacionado con un enmascaramiento diferencial de sitios con carga negativa que por el enmascaramiento del total de las cargas negativas, ya que en el sentido contrario (disminuye la carga de superficie), también existe inhibición. En este sentido, si el DEAE-D presenta poca afinidad por los sitios con carga negativa, al aumentar la carga de superficie, aumentaría el reparto del DEAE-D trayendo como consecuencia que ya no se concentrara en la vecindad de los efectores involucrados en la salida de potasio disminuyendo la promoción de la salida de potasio.

En general, los experimentos mostraron que se requiere la unión específica del catión a los sitios con carga negativa de la superficie para que el fenómeno de salida de potasio se presente. Es decir, independientemente de que se trate de un efecto generalizado sobre la carga de superficie, ya que un aumento generalizado de la carga de superficie no es en todos los casos un factor que defina la salida de potasio.

Este aspecto también se refleja en el hecho de que a pesar de que los compuestos ensayados, DEAE-D, DHS y  $TbCl_3$  se unen con diferente afinidad por los sitios con carga negativa de la superficie, no existe en este sentido una relación directa con la salida de potasio. Lo que señala que no es la disminución generalizada de la carga de superficie la involucrada en la salida de potasio.

Está reportado en la literatura ( Borst-Pauwels 1981), que la disminución de la carga de superficie de la levadura disminuye importantemente la afinidad con la que se une el  $K^+$  a su transportador de entrada y que ésto se refleja como una disminución en la captación del  $^{86}Rb^+$ . Como consecuencia de ésto, las determinaciones de potasio externo que realizamos podrían indicar tanto una inhibición de la entrada como un aumento de la salida de potasio. Sin embargo es claro de nuestros resultados que ni la DHS, ni el DEAE-D ni el  $TbCl_3$  tienen efecto sobre la afinidad del potasio por su transportador, sino su velocidad máxima, indicando que aunque abaten la carga de superficie, no lo hacen uniéndose a los sitios en la vecindad del transportador de potasio, los cuales sí afectan la

afinidad del potasio por su sitio de unión. Estos resultados nuevamente apuntan a que no se afecta de manera generalizada la carga de superficie. La excepción a este comportamiento fue el EB, el cual sí disminuyó la  $K_m$  para el transporte de potasio, coincidiendo con lo reportado previamente (Peña y Ramírez, 1975).

El hecho de que los cationes que utilizamos afecten de manera diferencial la carga de superficie es algo más que una inferencia si se toman en cuenta los resultados de la remoción del calcio de la levadura, los cuales muestran que existen diferencias en reactividad de los compuestos catiónicos respecto de los sitios que unen calcio y que este hecho no está relacionado con el fenómeno de salida de potasio, ya que se presentan de manera independiente. De igual manera, la explicación de la remoción del calcio puede ser por similitudes en reactividad y radio iónico del  $Tb^{3+}$  y el  $Ca^{2+}$  (Hughes, 1981), o por la capacidad de la DHS de complejar el  $Ca^{2+}$  y de remplazarlo en su sitio de unión (Barba-Behrens et al, 1990).

Otro de los aspectos estudiados que están relacionados con la carga de superficie fue la remoción de los compuestos catiónicos por lavados con  $MgCl_2$ . En principio estos resultados mostraron que la eliminación de los compuestos catiónicos trajo como consecuencia la reversión del efecto de salida de potasio promovido por ellos; lo cual es indicativo del sitio desde donde estos agentes catiónicos llevan a cabo su efecto. Es decir, que la salida de potasio promovida por compuestos catiónicos es un fenómeno que deriva de la interacción externa de los agentes catiónicos con la membrana.

## **VIII.2. Ruptura celular y salida de potasio de la levadura.**

En la literatura se ha reportado que al menos parte de la salida de potasio de la levadura pudiera deberse a una ruptura gradual de las levaduras inducida por las moléculas catiónicas (Peña et al, 1979; Borst-Pauwels et al, 1983). Entre los compuestos que se sabe inducen un efecto de todo o nada en la levadura están el ion mercurio (Kuypers y Roomans, 1979), el azul de metileno (Passow et al, 1959) y el bromuro de etidio (Theuvenet et al, 1983). Sin embargo, nuestros resultados mostraron que se requiere de un sustrato (glucosa) para que se lleve a cabo la salida de potasio de la levadura; lo que significa que las funciones metabólicas de la célula están intactas.

Otros resultados que concuerdan con este punto de vista son la restitución del transporte de potasio en la levadura que previamente había sido tratada con los agentes catiónicos. Es decir, si el lavado con cloruro de magnesio pudo eliminar el agente catiónico en mayor o menor medida, y se restituyó el transporte de potasio a nivel del control (DEAE-D y DHS), es porque la célula conservó la capacidad para contener el potasio. Debo señalar que los resultados obtenidos con el DEAE-D son especialmente interesantes en vista de que en reportes previos se le ha atribuido la capacidad de romper selectivamente la membrana plasmática sin afectar la membrana vacuolar; y de hecho se le utiliza como un método para discriminar los contenidos vacuolar y citoplásmico (Huber-Wälchli y Wiemken, 1979). También hay que señalar que otros autores (Kuypers y Roomans, 1979) mencionan que el DEAE-D produce efectos variables dependiendo de la población y especie de levadura que se utilice.

Nosotros utilizamos la medida del material que absorbe a 260 nm como una prueba de integridad celular. Los resultados muestran que aunque algunos compuestos promueven la salida de material que absorbe a 260 nm (fundamentalmente nucleótidos) como DEAE-D y DHS, el  $TbCl_3$  no lo promueve. Además de lo anterior, no existe una correlación estrecha entre la magnitud de salida de potasio y la de material que absorbe a 260 nm como se esperaría si estuviera ocurriendo ruptura celular. En principio estos resultados indican que no está ocurriendo ruptura celular por el tratamiento con los compuestos catiónicos utilizados.

Respecto a la salida de material que absorbe a 260 nm y la falta de correlación de este parámetro con la ruptura celular, quizá habría que considerar la posibilidad de que algunos de los compuestos ensayados estén alterando la salida de compuestos como ATP, timina y uracilo. En la literatura está reportado que la salida de ATP (Boyum y Guidotti, 1996; Boyum y Guidotti, 1997), timina y uracilo (Eddy, 1997) es dependiente de glucosa, se activa por desacoplantes y es independiente de la ruptura celular; datos que concuerdan con la salida de potasio que nosotros medimos.

Adicionalmente se cargaron las células con  $^{86}Rb^+$ , durante 24 horas con el fin de estudiar la salida de potasio. Estos resultados también muestran que tanto el tratamiento con DEAE-D, DHS y  $TbCl_3$ , no afecta la integridad celular, ya que de otro modo se

tendría una salida masiva de  $^{86}\text{Rb}^+$ . El tratamiento con EB sí parece promover la ruptura celular, hecho que concuerda con lo reportado previamente (Theuvenet et al,1983; Borst-Pauwels et al,1983). Sin embargo, esta ruptura parece ser parcial, ya que el efecto del EB se revirtió parcialmente por el lavado con el cloruro de magnesio, se conservó la dependencia de la glucosa en la mediación del fenómeno y no se observaron cambios sustanciales en la velocidad máxima del transporte de potasio por el tratamiento con el EB.

### **VIII.3. Dependencia de sustrato para la salida de potasio de la levadura.**

Como ya se había reportado previamente, la salida de potasio inducida por los compuestos catiónicos mostró dependencia de la glucosa como una característica común a todos los compuestos ensayados, así como a otros reportados anteriormente (Peña y Ramírez,1975; Peña y Ramírez,1991; Peña et al,1979; Peña et al,1980).

La dependencia de la glucosa no se puede atribuir al transporte mismo del sustrato, ni a eventos derivados del transporte como un aumento en la presión osmótica celular, ya que no se observó en presencia de los análogos no metabolizables de la glucosa. Es decir, a pesar que tanto 2-deoxiglucosa como 6-deoxiglucosa se transportan, no indujeron la salida de potasio. Tampoco se presentó la salida de potasio en presencia de xilosa, un sustrato no utilizado en las condiciones de nuestro experimento (M. Höfer, comunicación personal, Ho et al,1998). Por tanto los resultados apuntan a que la salida de potasio inducida por compuestos catiónicos depende de energía o de algún evento relacionado con el metabolismo de la glucosa.

De manera adicional, estos mismos experimentos muestran que la disminución inicial del pH como consecuencia de la fosforilación de la glucosa (Ramos et al,1989) no es una señal involucrada en la mediación de la salida; ya que de otra manera se hubiera presentado el fenómeno en presencia de la 2-deoxiglucosa, la cual se fosforila en C6 y no se hubiera presentado en 6-deoxiglucosa.

Respecto al requerimiento de glucosa para observar los efectos de los compuestos catiónicos, se exploró la posibilidad de que la glucosa causara un aumento en la carga negativa de superficie. Los resultados de la unión de  $\text{Tb}^{3+}$  a la carga de superficie indican

que no sucede tal cosa. De igual manera, se evaluó este parámetro usando la 9-aminoacridina obteniendo resultados similares (datos no mostrados).

No podemos descartar la posibilidad de que la glucosa promueva la accesibilidad de cargas negativas específicas en la vecindad de los transportadores de potasio involucrados en la fenomenología de salida de potasio, permitiendo la unión de estas cargas por los agentes catiónicos ensayados, lo que se ha demostrado que produce desviaciones en la cinética de transporte de cationes (Dorst-Pauwels, 1981; Cerbón y Calderón, 1990). Sin embargo, tal explicación sería difícil de demostrar si las sondas utilizadas no fueran capaces de discriminar este cambio.

#### **VIII.4. La presión osmótica y salida de potasio.**

Resultados del grupo de Rodríguez muestran que la salida de potasio de la levadura dependiente de glucosa varía de manera directamente proporcional con el contenido celular de potasio (Ramos et al, 1990). Este control se conservó en las células tratadas con DEAE-D y con  $TbCl_3$ , pero la salida de potasio inducida por DHS y EB se mostró menos sensible al contenido celular de potasio.

En principio esto indicaría que se ha perdido la integridad celular, lo cual concuerda con los resultados obtenidos de salida de  $^{86}Rb^+$  para el EB, pero están en desacuerdo con los obtenidos con DHS. Alternativamente podría considerarse que si se elimina la dependencia de la salida de potasio por el potasio interno esto indicaría que, en ausencia de ruptura celular; la DHS se transporta al interior de la levadura y que desde este compartimento se realiza la promoción de la salida de potasio.

Analizando los resultados de eliminación de los compuestos catiónicos con cloruro de magnesio, no observamos la reversión de la salida de potasio, hecho que puede sugerir que parte del DHS se transporta hacia el interior de la célula. Esta posibilidad ha sido evaluada por el Dr. Peña con ( $^3H$ )-DHS y sus resultados permitieron concluir que efectivamente parte de la DHS se interna a la célula.

Desde otro punto de vista, las diferencias hasta ahora reseñadas podrían indicar que el DEAE-D y el  $TbCl_3$  promueven la salida de potasio de la levadura si existen diferencias en presión osmótica entre los compartimentos intracelular y extracelular, o simplemente

por la diferencia de concentración entre el interior y el exterior. Tal observación parece no estar tan alejada del hecho de que la salida de potasio dependiente de glucosa se presenta cuando se transfieren las células a un medio carente de potasio (Peña et al. 1979; Rothstein y Bruce, 1958a; Rothstein y Bruce, 1958b).

Por este motivo utilizamos 0.8M de sorbitol con el fin de disminuir las diferencias en presión osmótica entre ambos compartimentos y determinamos la salida de potasio de levaduras tratadas con DEAE-D y con DHS. Es decir, un agente que mostró que promueve la salida de potasio de manera sensible al contenido celular de potasio y otro que no se mostró sensible.

Las curvas de concentración de sorbitol mostraron que a partir de 0.6M de sorbitol se inhibió totalmente la salida de potasio de la levadura tratada con DEAE-D; sin embargo, en los experimentos utilizamos 0.8M de sorbitol. Estos resultados fueron como se propuso: se inhibe totalmente la salida de potasio en las células tratadas con DEAE-D que es sensible al contenido interno de potasio y se obtuvo un efecto parcial, cualitativamente diferente, en las células tratadas con DHS que mostró previamente ser parcialmente sensible al contenido intracelular de potasio.

Estos experimentos fueron realizados también con galactosa 0.8M, repitiéndose exactamente los resultados anteriores, lo que indica que es un efecto de la presión osmótica del sorbitol sobre la levadura lo que inhibe la salida de potasio por el DEAE-D.

Respecto a la carga de superficie, se puede descartar que el sorbitol o la galactosa impidan el acercamiento del compuesto catiónico dado que existen diferencias en cuanto a los resultados obtenidos con DEAE-D y con DHS. A este respecto, resultados parciales utilizando  $Tb^{3+}$  como sonda para determinar la carga de superficie, muestran que el sorbitol 0.8 M no afecta sustancialmente la unión de  $Tb^{3+}$  (J. González, comunicación personal).

Sin duda, nuestros resultados son indicativos de que la unión de DEAE-D a la superficie celular podría alterar el funcionamiento de algún sistema de salida de potasio sensible a la presión osmótica. Un candidato sería el canal mecanosensible descrito por Gustin et al (1988), que se sabe que se activa por estiramiento de la membrana, y una

propuesta sería que el DEAE-D unido a la superficie celular promueva tensión en la membrana, si existen diferencias en la presión osmótica entre el interior y el exterior, y que cuando tales diferencias disminuyen también disminuye la tensión ejercida por el DEAE-D, disminuyendo consecuentemente la salida de potasio.

Estos efectos del DEAE-D se proponen por efectos estéricos derivados de la unión de moléculas de DEAE-D a sitios negativos vecinos.

#### **VIII.5. Efectos sobre el pH interno y el potencial de membrana.**

Resultados anteriores de nuestro laboratorio (Peña y Ramírez, 1991) indicaban la posibilidad de que el cloruro de terbio estuviera activando un sistema intercambiador  $K^+/H^+$ , el cual funcionara sacando potasio y metiendo iones  $H^+$  a la célula. Esta actividad de intercambio pudo ser demostrada en un sistema reconstituido por Ramírez et al (1996) y Camarasa et al (1996).

Los resultados de nuestros experimentos concuerdan con el hecho de que el  $TbCl_3$  pudiera estar activando tal sistema intercambiador, dado que este agente aumenta la salida de potasio y disminuye el pH, por un aumento en la entrada de protones. Este aumento de la entrada de protones lo vemos como una actividad menor de las determinaciones de la bomba de protones medida con un electrodo específico de protones. Además, el  $TbCl_3$  no afectó apreciablemente el potencial de membrana, lo cual es indicativo de un sistema electroneuro como el propuesto intercambiador  $K^+/H^+$  que no afectara el potencial de membrana.

Los dos agentes catiónicos restantes (DEAE-D y DHS) no mostraron un efecto estimulador sobre un antiportador putativo  $K^+/H^+$ ; por el contrario, en su presencia ocurre un aumento del pH coincidente con el aumento del bombeo de protones, lo que en principio produciría un aumento en el potencial de membrana por aumento de la concentración celular de aniones. Nuestros resultados no mostraron tal hecho, porque no afectaron notoriamente el potencial de membrana determinado con cianina (Peña et al, 1984). Lo que podría indicar que estuvieran saliendo contraiones conjuntamente con los  $H^+$ , como lo indican los resultados de Peña y Ramírez (1991), quienes pudieron medir un aumento del Pi por el tratamiento con compuestos catiónicos .

## IX. PERSPECTIVAS.

La investigación futura estaría encauzada a la búsqueda de los elementos involucrados en la salida de potasio de la levadura por efecto del tratamiento con compuestos catiónicos. Dentro de estos es necesario definir la participación del intercambiador  $K^+/H^+$ , el cual según nuestros resultados se activa por el tratamiento con  $TbCl_3$ .

Por principio de cuentas es necesario conocer al o los sitios a los cuales se une el  $Tb^{3+}$  y al respecto en el laboratorio se adaptó una técnica para medir el Tb residual por complejación con el ácido dipicolínico que da un complejo fluorescente. En este aspecto se encuentra trabajando actualmente la Dra. Judith González.

En el laboratorio se cuenta con algunas mutantes como *kha1*, construida por Jorge Ramírez (Ramírez et al., 1998) cuyo gene codifica para un intercambiador  $K^+/H^+$ , la mutante del gene *NHA1* que codifica para un intercambiador  $Na^+/H^+$  (Bañuelos et al., 1998) y que fue construida por la Dra. Hana Sychrova, así como mutantes de *TOK1* que codifica para un canal de potasio rectificador saliente (Ketchum et al., 1995) y mutantes de los genes *TRK1* y *TRK2*, que codifican para los transportadores de potasio de alta y baja afinidad respectivamente. Con esta batería de mutantes y otras dobles y triples mutantes que se construyan como: *trk1-tok1*, *tok1-kha1*, *tok1-nha1*, *kha1-nha1*, *trk1-kha1*, *trk1-nha1*, *tok1-kha1-nha1*, *trk1-tok1-kha1* y *tok1-trk1-nha1* será posible definir la relevancia de cada una de estos transportadores en la salida de potasio de la levadura y también conocer si el terbio se une al intercambiador  $K^+/H^+$ .

Otro aspecto que es necesario evaluar es la respuesta de los movimientos de potasio ante los cambios de la presión osmótica externa. Al respecto, en agosto de este año apareció en la literatura publicado el papel del gene *MID1* el cual codifica para un canal de potasio sensible al estiramiento (Kanzaki et al., 1999) con propiedades aparentemente diferentes a las del canal mecanosensible caracterizado por el grupo de Kung (Gustin et al., 1988). Sería necesario contar con la mutante de *MID1*, o construir una mutante de este gene y de la misma manera como se describió el caso de *KHA1* y *NHA1* definir si el producto del gene *MID1* es el blanco de las acciones del DEAE-D.



Algo que debe notarse es que el uso del DEAE-D puso de manifiesto un mecanismo mecanosensible que utiliza al Potasio cuando la presión osmótica interna es mayor que la externa y se revierte cuando ocurre lo contrario, o bien se igualan las presiones a ambos lados de la membrana plasmática. Un mecanismo que opera de manera semejante a través del producto del gene FPS1, permite la salida de glicerol de la célula y está regulado por la vía HOG (crecimiento en alta osmolaridad) (Tamas et al., 1999). La convergencia de este mecanismo con la salida de potasio inducida por DEAE-D, hace necesario evaluar cómo operan estos mecanismos que le permiten a la célula contender con los cambios en la presión osmótica externa. Es decir, si operan al mismo tiempo, si requieren de glucosa para operar, si en ambos casos están influenciados por cambios en la carga de superficie, si se regulan por los mismo efectores de la vía HOG, etc.

Hemos hecho un primer intento por entender esta convergencia al caracterizar la salida de potasio inducida por DEAE-D en mutantes de FPS1, la cual nos fue donada por el Dr. Hohmann de la Universidad Católica de Lovaina, Bélgica. Resultados preliminares, no publicados, indican que los mecanismos operan de manera independiente. Sin embargo, la inexistencia de uno de ellos (FPS1) parece no aumentar la salida de potasio. Aunque debo señalar que no se han determinado otros parámetros como cambios en el pH celular, concentración celular de potasio, potencial de membrana ni la carga de superficie que permitan entender mejor la similitud del fenómeno.

Otro de nuestros intereses sería explorar si con DEAE-D estamos activando algún mecanismo sensor de la integridad celular y por ello sería interesante evaluar si la salida de potasio inducida por DEAE-D está relacionada con esta vía, la cual involucra la actividad de la cinasa PKC y los productos de los genes MID2 y SLG1 (de Bettignies et al., 1999). Nuevamente, como en el caso anterior, la letalidad se revierte con la estabilización osmótica por el uso de sorbitol 1M (de Bettignies et al., 1999); lo cual coincide con la reversión de la salida de potasio de la levadura que nos pudiera indicar que la salida de potasio de la levadura estaría involucrada en la estabilización osmótica cuando existen cambios osmóticos a ambos lados de la membrana plasmática.

Y como en el caso del transporte de glicerol, un primer enfoque para entender el fenómeno sería la caracterización fisiológica del transporte y salida de potasio de las levaduras mutantes de la vía PKC.

En el presente trabajo no exploramos la procedencia del potasio que se sale por efecto del tratamiento con los compuestos catiónicos, una idea que surgió de un trabajo de tesis paralelo desarrollado por la Dra. Ruth López (Ruth López, tesis doctoral, 1999) indicaba que en la acumulación de potasio por la levadura participaba el ion  $\text{HCO}_3^-$  y que pudieran acumularse en la vacuola grandes cantidades de este anión. Esta es una idea que tiene su fundamento en el hecho de que está reportado que la vacuola es un reservorio de 2/3 partes del potasio celular (Ohsumi et al., 1988) o del 50% del contenido celular del potasio (Huber-Wälchli y Viemken, 1979).

Esta situación nos reunió a la Dra. Ruth López y a mí en la tarea de tratar de permeabilizar la levadura sin afectar la membrana vacuolar, usando DEAE-D, tratando de adaptar el método de Huber-Wälchli y Viemken. Este trabajo lo desarrolló en su tesis de licenciatura Fabiola Jiménez. Los resultados de este trabajo fueron, entre otros, que la levadura *Saccharomyces cerevisiae* sobrevivía en un 97% al tratamiento con 200  $\mu\text{g}$  de DEAE-D por mg de levadura (F. Jiménez, tesis de licenciatura, 1997). Estos resultados y los aquí consignados señalan que el DEAE-D no causa ruptura celular, por lo que decidimos ensayar con concentraciones subletales de CTAB, trabajo en el que nos hemos involucrado la Dra. Ruth López, la Dra. Martha Calahorra y yo. Este equipo de trabajo por sugerencia del Dr. Peña también ha estado interesado en evaluar fisiológicamente las características de la ruptura celular inducida por la Nistatina con el fin de comparar nuestros resultados y los obtenidos por el tratamiento con CTAB.

El fracaso para permeabilizar la membrana plasmática de la levadura utilizando DEAE-D y el conocimiento obtenido en mi trabajo de que el DEAE-D puede removerse de la superficie celular y revertir los efectos de salida de potasio de la levadura, permitieron abordar un problema que tenía la Dra. Ruth López en el desarrollo de sus experimentos:

el control del contenido celular de potasio. Este problema se abordó por medio de lavados con DEAE-D para después eliminar este catión con  $MgCl_2$ , estos resultados están consignados en el artículo de López (López, et al., 1999). Respecto a este trabajo otra colaboración consistió en el desarrollo y realización del protocolo para medir el transporte del ácido propiónico que desarrollamos conjuntamente la Dra. López y yo.

El contar con un método para permeabilizar selectivamente la membrana plasmática, permitirá estudiar, entre otros casos, el transporte de iones y otras sustancia por la vacuola. Y en relación con esto resultados preliminares, no publicados, desarrollados por nosotros han permitido conocer que efectivamente el  $HCO_3^-$  se transporta a la vacuola utilizando un canal aniónico.

Otro aspecto que se evaluó parcialmente en este trabajo fue la dependencia del fenómeno de la glucosa. Lo que propongo es que se evalúe la participación de la vía relacionada con la detección de glucosa en relación a la homeostasis del potasio en la levadura. En este sentido en la literatura está actualmente reportándose la participación de los genes HAL4 y HAL5 en relación a la modulación de la captación de potasio (Mulet et al., 1999). Sin embargo no existe nada en relación con el control del eflujo de potasio de la levadura. La diferente respuesta de la salida de potasio por el tratamiento con cationes que se da en presencia de glucosa pudiera estar controlada a nivel del transporte mismo del azúcar o bien a nivel de la generación de una señal en la cual están involucrados los productos de los genes SNF3 y RGT2 (Johnston, 1999).

Obviamente, como en todos los casos anteriores, contar con las mutantes adecuadas nos permitiría saber la manera como se regula la salida de potasio de la levadura que es parte del objetivo general del grupo del Dr. Peña.

ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA

## X. CONCLUSIONES.

- La salida de potasio de la levadura inducida por el tratamiento con compuestos catiónicos requiere de la unión de los compuestos catiónicos a la superficie celular. Sin embargo, esta salida está promovida por la unión de algunos compuestos a ciertos grupos en la superficie celular. Es decir, depende de reactividad de los compuestos con los diferentes grupos y un cierto grado de selectividad hacia los mismo grupos negativos de superficie. Esto, sin duda, da como resultado que los compuestos catiónicos utilizados no presenten un mismo patrón de respuesta a las diferentes pruebas con que los evaluamos, lo que implica que diferentes mecanismos están involucrados en la promoción de la salida de potasio por los compuestos catiónicos.
- Los mecanismos involucrados en la salida de potasio dependen de la presencia de un catión, independientemente de la estructura química del mismo. Otro requisito necesario es la presencia de un sustrato metabolizable, y parece estar mediado por el *metabolismo* mismo y no por otros aspectos derivados de la presencia misma del azúcar como apantallamiento de grupos.
- Excepto el bromuro de etidio, los cationes ensayados no causaron la salida masiva de potasio por ruptura celular.
- El efecto que la unión de los compuestos catiónicos tienen sobre la carga de superficie, *no se manifestó en una disminución del transporte de  $^{86}\text{Rb}$  a la célula*, por lo que no se trata de un efecto generalizado sobre la carga de superficie.
- El efecto de los compuestos catiónicos es reversible por lavado con cloruro de magnesio, en mayor o menor grado; indicando que la salida de potasio de la levadura por estos compuestos catiónicos es un fenómeno de membrana.
- Respecto a los agentes catiónicos utilizados: tanto DEAE-D como  $\text{TbCl}_3$  presentan efectos más claros sobre la salida de potasio. En relación al primero se mostró sensible a los cambios en la presión osmótica entre los compartimentos intracelular y extracelular. Es posible que su efecto esté mediado por algún acarreador de potasio mecanosensible, que pudiera estar involucrado en un mecanismo de regulación de la presión osmótica a través de la salida del potasio celular.

## XI. BIBLIOGRAFIA

- André, B. (1995). An overview of membrane transport proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*. 11:1575-1611.
- Armstrong, W. McD. and Rothstein, A. (1964). Discrimination between alkali metal cations by yeast. I. Effect of pH on uptake. *J. Gen. Physiol.* 48:61-71.
- Armstrong, W. McD. (1958). The effect of some dyestuffs on the metabolism of the baker's yeast. *Arch. Biochem. Biophys.* 73:153-161.
- Armstrong, W. McD. and Rothstein, A. (1967). Discrimination between alkali metal cations by yeast. II. Cation interactions in transport. *J. Gen. Physiol.* 50(4):967-988.
- Balzi, E. and Goffeau, A. (1994). Genetics and Biochemistry of yeast Multi-drug resistance. *Biochim. Biophys. Acta.* 1187:152-162.
- Bañuelos, M. A.; Sychrova, H.; Bleykasten-Grosshans, C.; Souciet, J. L. and Potier, S. (1998). The NHA1 antiporter of *Saccharomyces cerevisiae* mediates sodium and potassium efflux. *Microbiol.* 144(pt10):2749-2758.
- Barba-Behrens, N.; Bautista, J. L.; Ruiz, M. E.; Joseph-Nathan, P.; Flores-Parra, A. and Contreras, R. (1990). Coordination compounds derived from the interaction of streptomycin and cobalt, nickel, copper and calcium salts characterized by <sup>13</sup>C-NMR and spectroscopic studies. Structure and bonding properties of the streptidine fraction. *J. Inorg. Biochem.* 40:201-215.
- Barela, T. D. and Sherry, A. D. (1976). A simple, one-step fluorometric method for determination of nanomolar concentrations of terbium. *Anal. Biochem.* 71:351-357.
- Berti, A. and Slayman, C. L. (1992). Complex modulation of cation channels in the tonoplast and plasma membrane of *Saccharomyces cerevisiae* : single-channel studies. *J. Exp. Biol.* 172:271-287.
- Borst-Pauwels, G. W. F. H.; Wolters, G. H. J. and Henricks, J. J. G. (1971). The interaction of 2,4-dinitrophenol with anaerobic Rb<sup>+</sup> transport across the yeast cell membrane. *Biochim. Biophys. Acta* 225:269-276.
- Borst-Pauwels, G. W. F. H. (1981). Ion transport in yeast. *Biochim. Biophys. Acta* 650:88-127.
- Borst-Pauwels, G. W. F. H.; Theuvenet, A. P. R. and Stols, A. L. H. (1983). All-or-none interactions of inhibitors of the plasma membrane ATPase with *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim. Biophys. Acta* 732:186-192.
- Borst-Pauwels, G. W. F. H. and Theuvenet, A. P. R. (1984). Apparent saturation kinetics of divalent cation uptake in yeast caused by a reduction in the surface potential. *Biochim. Biophys. Acta* 771:171-176.

- Boyum, R. and Guidotti, G. (1996). Effect of ATP binding cassette/multidrug resistance proteins on ATP efflux of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 230:22-26.
- Boyum, R. and Guidotti, G. (1997). Sac1p of *Saccharomyces cerevisiae* is not involved in ATP release to the extracellular fluid. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 236:50-53.
- Brunner, A.; Carrasco, N. and Peña, A. (1982). Correlation between resistance to ethidium bromide and changes in monovalent cation uptake in yeast. *Arch. Biochem. Biophys.* 217(1):30-36.
- Calahorra, M.; Martínez, G. A.; Hernández-Cruz, A. and Peña, A. (1998). Influence of monovalent cations on yeast cytoplasmic and vacuolar pH. *Yeast.* 14:501-515.
- Camarasa, C.; Prieto, S.; Ros, R.; Salmon, J. M. and Barne, P. (1996). Evidence for a selective and electroneutral  $K^+/H^+$  exchange in *Saccharomyces cerevisiae* using plasma membrane vesicles. *Yeast* 12:1301-1313.
- Cerbon, J. and Calderon, V. (1990). Proton-linked transport systems as sensors of changes in the membrane surface potential. *Biochim. Biophys. Acta* 1028(3):261-267.
- Conway, J. and Duggan, F. (1958). A cation carrier in the yeast cell wall. *Biochem. J.* 69: 265-274.
- de Bettignies, G.; Barthe, C.; Morel, C.; Peypouquet, M. F.; Doignon, F. and Crouzet, M. (1999). RGD1 genetically interacts with MID2 and SLG1, encoding two putative sensors for cell integrity signalling in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 15 (16): 1719-1731.
- Dufour, J. P.; Boutry, M. and Goffeau, A. (1980). Plasma membrane ATPase of yeast. *J Biol. Chem.* 255(12):5735-5741.
- Eddy, A. A. (1997). Expulsion of uracil and thymine from the yeast *Saccharomyces cerevisiae* : contrasting responses to changes in the proton electrochemical gradient. *Microbiol.* 143:219-229.
- Eilam, Y. (1983). Membrane effects of phenothiazines in yeasts. 1. Stimulation of calcium and potassium fluxes. *Biochim. Biophys Acta* 733:242-248.
- Elferink, J. G. R. and Booij, H. L. (1975). The action of some triphenylmethane dyes on yeast and erythrocyte membranes. *Arzneim. Forsch.* 25:1248-1252.
- Epstein, W. and Laimins, L. (1980). Potassium transport in *Escherichia coli*: diverse systems with common control by osmotic forces. *Trends Biochem. Sci.* 5:21-23.
- Foury, F.; Boutry, M. and Goffeau, A. (1977). Efflux of potassium induced by Dio-9, a plasma membrane ATPase inhibitor in the yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *J. Biol. Chem.* 252(13):4577-4583.
- Gaber, R. F. (1992). Molecular genetics of yeast ion transport. *Intl. Rev. Cytol.* 137A:299-353.
- Gerhardt, P. and Judge, J. A. (1964). Porosity of isolated cell walls of *Saccharomyces cerevisiae* and *Bacillus megaterium*. *J. Bacteriol.* 87(4):945-951.

- Goffeau, A. and Slayman, C. W. (1981). The proton translocating ATPase of the fungal plasma membrane. *Biochim. Biophys. Acta* 639:197-223.
- Gustin, M. C.; Martinac, B.; Saimi, Y.; Culbertson, M. R. and Kung, C. (1986). Ion channels in yeast. *Science* 233:1195-1197.
- Gustin, M. C.; Zhou, X. L.; Martinac, B. and Kung, CH. (1988). A mechanosensitive ion channel in the yeast plasma membrane. *Science* 242:762-765.
- Haro, R.; Garcíadeblas, B. and Rodríguez-Navarro, A. (1991). A novel P-type ATPase from yeast involved in sodium transport. *FEBS Lett.* 291(2):189-191.
- Ho, N. W.; Chen, Z. and Brainard, A. P. (1998). Genetically engineered *Saccharomyces* yeast capable of effective cofermentation of glucose and xylose. *Appl. Environ. Microbiol.* 64 (5):1852-1859.
- Huber-Wälchli, V. and Wiemken, A. (1979). Differential extraction of soluble pools from the cytosol and the vacuoles of yeast (*Candida utilis*) using DEAE-dextran. *Arch. Microbiol.* 120:141-149.
- Hughes, M. N. The inorganic chemistry of biological processes. John Wiley and Sons. 2nd edition. New York 1981.
- Jiménez Rojas Fabiola. (1997). Tesis de Licenciatura. Efecto del dietilaminoetil-dextrán sobre la membrana de *Saccharomyces cerevisiae*. Universidad Autónoma Benito Juárez de Oaxaca. Oaxaca de Juárez, México.
- Johnston, M. (1999). Feasting, fasting and fermenting. *Trends in Genetics* 15(1):29-33.
- Kanzaki, M.; Nagasawa, M.; Kojima, I.; Sato, Ch.; Naruse, K.; Sokabe, M. and Lida, H. (1999). Molecular identification of a eukaryotic stretch-activated nonselective cation channel. *Science* 285: 882-886.
- Ketchum, K. A.; Joiner, W. J.; Sellers, A. J.; Kaczmarek, L. K. and Goldstein, S. A. N. (1995). A new family of outwardly rectifying channel proteins with two pore domains in tandem. *Nature.* 376:690-695.
- Ko, C. H. and Gaber, R. F. (1991). TRK1 and TRK2 encode structurally related  $K^+$  transporters in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 8:4266-4273.
- Kuypers, G. A. J. and Roomans, G.M (1979). Mercury-induced loss of  $K^+$  from yeast cells investigated by electron probe x-ray microanalysis. *J. Gen. Microbiol.* 115:13-18.
- Lesage, F.; Guillemare, E.; Fink, M.; Duprat, F.; Lazdunski, M.; Romey, G. and Barhanin, J. (1996). A pH-sensitive yeast outward rectifier  $K^+$  channel with two pore domains and novel gating properties. *J. Biol. Chem.* 271(8):4183-4187.
- Levitt, D. G. (1980). The mechanism of the sodium pump. *Biochim. Biophys. Acta* 604:321-345.
- Lopatin, A. N.; Markhina, E. N. and Nichols, G. C. (1995). The mechanism of inward rectification of potassium channels: long-pore plugging by cytoplasmic polyamines. *J. Gen. Physiol.* 106:923-955.

López Alcántara Ruth (1999) Tesis Doctoral. El papel de los ácidos orgánicos débiles y el bicarbonato en la acumulación de  $K^+$  en la levadura Universidad Nacional Autónoma de México. Ciudad de México, México.

López, R.; Enriquez, E. and Peña, A. (1999). Effects of weak acids on cation accumulation,  $\Delta pH$ , and  $\Delta \Psi$  in yeast. *Yeast* 15: 553-562.

Massart, L.; Peeters, G. and Vanhoucke, A. (1947) *Arch. Intl. Pharmacodyn.* 75:210 - 221. Citado en 11.

McCusker, J. H.; Perlin, D. S. and Haber, J. E. (1987). Pleiotropic plasma membrane ATPase mutation of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 7:4082-4088.

Mulet, J. M.; Leube, M. P.; Kron, S. J.; Rios, G.; Fink, G. and Serrano, R. (1999). A novel mechanism of ion homeostasis and salt tolerance in yeast: the HAL4 and HAL5 protein kinases modulate the Trk1-Trk2 potassium transporter. *Mol. Cell. Biol.* 19(5): 3328-3337.

Ogino, T.; den Hollander, J. A. and Schulman, R. G. (1983).  $^{39}K$ ,  $^{23}Na$ , and  $^{31}P$  NMR studies of ion transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80(17):5185-5189.

Ohsumi, Y.; Kitamoto, K. and Anraku, Y. (1988). Changes induced in the permeability barrier of the yeast plasma membrane by cupric ion. *J. Bacteriol.* 170(6):2676-2682.

Passow, H. ; Rothstein, A. and Loewenstein, B. (1959). An all-or-none response in the release of potassium by yeast cells treated with methylene blue and other basic redox dyes. *J. Gen. Physiol.* 43:97-107.

Passow, H. and Rothstein, A. (1960). The binding of mercury by the yeast cell in relation to changes in permeability. *J. Gen. Physiol.* 43:621-633.

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

Peña, A. (1975). Studies on the mechanism of  $K^+$  transport in yeast. *Arch. Biochem. Biophys.* 167:397-409.

Peña, A. and Ramírez, G. (1975). Interaction of ethidium bromide with the transport system for monovalent cations in yeast. *J. Membr. Biol.* 22:369-384

Peña, A. (1976). The proton pump in the yeast cell membrane. *Mitochondria. Bioenergetics, Biogenesis and membrane structure.* Academic press. 21-30.

Peña, A. (1978). Effect of ethidium bromide on  $Ca^{2+}$  uptake by yeast. *Membr. Biol.* 42:199-213.

Peña, A.; Mora, M. A. and Carrasco, N. (1979). Uptake and effects of several cationic dyes on yeast. *J. Membr. Biol.* 47:261-284.

Peña, A.; Clemente, S. M.; Borbolla, M.; Carrasco, N. and Uribe, S. (1980). Multiple interactions of ethidium bromide with yeast cells. *Arch. Biochem. Biophys.* 201(2):420-428.



Peña, A.; Borbolla, M.; Uribe, S.; Carrasco, N. and Clemente, S. M. (1981). The effects of alkylguanidines on monovalent cation transport in yeast. Proceedings of the Vth International Symposium on Yeast. Pergamon Press : 485-489.

Peña, A. (1982). The transport of cations in yeast, characteristics and postulated mechanisms. Proceedings of the VI International Symposium of yeast. Pergamon Press. 305-310.

Peña, A.; Uribe, S.; Pardo, J. P. and Borbolla, M. (1984). The use of a cyanine dye in measuring membrane potential in yeast. Arch. Biochem. Biophys. 231(1):217-225.

Peña, A. and Ramírez, J. (1991). An energy-dependent efflux of potassium ions in yeast. Biochim. Biophys. Acta 1068:237-244.

Peña, A.; Ramirez, J.; Rosas, G. and Calahorra, M. (1995). Proton pumping and the internal pH of yeast cells, measured with pyranine introduced by electroporation. J. Bacteriol. 177(4):1017-1022.

Ramírez, J.; Peña, A. and Montero-Lomelí, M. (1996). H<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> exchange in reconstituted yeast plasma membrane vesicles. Biochim. Biophys. Acta 1285:175 - 182.

Ramírez, J.; Ramírez, O.; Saldaña, C.; Coria, R. and Peña, A. (1998). A *Saccharomyces cerevisiae* mutant lacking a K<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger. J. Bacteriol. 180(22):5860-5865.

Ramos, J.; Contreras, P. and Rodríguez-Navarro, A. (1985). A potassium transport mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. Arch. Microbiol. 143:88-93.

Ramos, J. and Rodríguez-Navarro, A. (1986). Regulation and interconversion of the potassium transport systems of *Saccharomyces cerevisiae* as revealed by rubidium transport. Eur. J. Biochem. 154:307-311.

Ramos, J.; Haro, R. and Rodríguez-Navarro, A. (1990). Regulation of potassium fluxes in *Saccharomyces cerevisiae*. Biochim. Biophys. Acta 1029(2):211-217.

Ramos, J.; Alijo, R.; Haro, R. and Rodríguez-Navarro, A. (1994). TRK2 is not a Low-affinity potassium transporter in *Saccharomyces cerevisiae*. J. Bacteriol. 176(1):249-252.

Ramos, S.; Balbín, M.; Raposo, M.; Valle, E. and Pardo, L. A. (1989). The mechanism of intracellular acidification induced by glucose in *Saccharomyces cerevisiae*. J. Gen. Microbiol. 135:2413-2422.

Reid, J. D.; Lukas, W.; Shafaatian, R.; Bertl, A.; Scheurmann-Kettner, C.; Guy, H. R. and North, A. (1996). The *S. cerevisiae* outwardly-rectifying potassium channel (DUK1) identifies a new family of channels with duplicated pore domains. Recept. Chann. 4:51-62.

Rodríguez-Navarro, A. and Ramos, J. (1984). Dual system for potassium transport in *Saccharomyces cerevisiae*. J. Bacteriol. 159:940-945.

Roomans, G. M. and Borst-Pauwels, G. W. F. H. (1978). Co-transport of anions and neutral solutes with cations across charged biological membranes. Effects of surface potential on uptake kinetics. J. Theor. Biol. 73:453-468.

- Roomans, G. M. and Borst-Pauwels, G. W. F. H. (1979). Interaction of cations with phosphate uptake by *Saccharomyces cerevisiae*. Effects of surface potential. *Biochem. J.* 178:521-527.
- Rothstein, A. and Bruce, M. (1958a). The efflux of potassium from yeast cells into a potassium free medium. *J. Cell. Comp. Physiol.* 51:439-455.
- Rothstein, A. and Bruce, M. (1958b). The potassium efflux and influx in yeast at different potassium concentrations. *J. Cell. Comp. Physiol.* 51:145-159.
- Scherrer, R.; Louden, L. and Gerhardt, P. (1974). Porosity of the yeast cell wall and membrane. *J. Bacteriol.* 118(2):534-540.
- Schwencke, J. (1991). Vacuoles, internal membranous systems and vesicles. *The Yeasts* vol. 4, 2a. edición Capítulo 8.
- Serrano, R. (1983). In vivo glucose activation of the yeast plasma membrane ATPase. *FEBS lett.* 156:11.
- Serrano, R.; Kielland-Brandt, M. C. and Fink, G. R. (1986). Yeast plasma membrane ATPase is essential for growth and has homology with (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>), K<sup>+</sup>, and Ca<sup>2+</sup> ATPases. *Nature* 319:689-693.
- Serrano, R. (1991). Transport across yeast vacuolar and plasma membranes. *The molecular and Cellular Biology of the yeast Saccharomyces: Genome Dynamics, Protein Synthesis and Energetics.* Volúmen 1, Capítulo 9.
- Tamas, M. J.; Luyten, K.; Sutherland, F. C.; Hernández, A.; Albertyn, J.; Valadi, H.; Li, H.; Prior, B. A.; Kilian, S. G.; Ramos, J.; Gustafsson, L.; Thevelein, J. M. and Hohmann, S. (1999). Fps1p controls the accumulation and release of the compatible solute glycerol in yeast osmoregulation. *Mol. Microbiol.* 31(4): 1087-1104.
- Theuvenet, A. P. R.; Bindels, R. J. M.; van Amelsvoort, J. M. N. and Borst-Pauwels, G. W. F. H. (1983). Interaction of ethidium bromide with yeast cells investigated by electron probe x-ray microanalysis. *J. Membr. Biol.* 73:131-136.
- Theuvenet, A. P. R.; van de Wijngaard, W. M. H.; van de Rijke, J. W. and Borst-Pauwels, G. W. F. H. (1984). Application of 9-aminoacridine as a probe of the surface potential experienced by cation transporters in the plasma membrane of yeast cells. *Biochim. Biophys. Acta* 775:161-168.
- Ulazewski, S.; Balzi, E. and Goffeau, A. (1987). Genetic and molecular mapping of the pma1 mutation conferring vanadate resistance to the plasma membrane ATPase from *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Gen. Genet.* 207:38-47.
- Ulazewski, S.; Van Herck, J. C.; Dufour, J. P.; Kulpa, J.; Nieuwenhuis, B. and Goffeau, A. (1987). A single mutation confers vanadate resistance to the plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase from the yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *J. Biol Chem.* 262:223-228.
- van der Rest, M. E.; Kamminga, A. H.; Nakano, A.; Anraku, Y.; Poolman, B. and Konings, W. N. (1995). The plasma membrane of *Saccharomyces cerevisiae*: structure, function and biogenesis. *Microbiol. Rev.* 59(2):304-322.

# APENDICE

## Potassium ion efflux induced by cationic compounds in yeast

Emanuel Enríquez-Freire \*, Ruth López, Antonio Peña

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

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

### Abstract

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

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

### 1. Introduction

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

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

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

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

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

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

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

## 2. Materials and methods

### 2.1. Yeast and growth conditions

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

### 2.2. External potassium determinations

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

### 2.3. Proton pumping activity

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

### 2.4. Internal pH

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

### 2.5. Estimation of the membrane potential

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

### 2.6. Rubidium uptake experiments

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

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

### 2.7. Surface charge determinations

Surface charge determinations were made according to Theuvenet et al [18]. Two  $\mu\text{M}$  9-aminoacridine was added to a medium containing 2 mM MES-TEA buffer (pH 6.0), 1  $\mu\text{M}$  antimycin A, different concentrations of any of the cationic compounds (from 1 to 100  $\mu\text{M}$ ) and 25 mg of fresh cells. The cells were centrifuged immediately after mixing and the supernatant was collected for fluorometric determinations of the 9-aminoacridine using the wavelength pair for excitation and emission, 400 nm and 454 nm, respectively. The surface charge was calculated from the difference after measurement with 10 mM  $\text{MgCl}_2$ . 9-Aminoacridine binding versus concentration of the cationic compounds plots were built and from these plots the concentration of the cationic compound inhibiting half 9-aminoacridine binding was calculated.

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

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

### 2.9. $\text{Rb}^+$ efflux determinations

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

cose, with or without any of the following cationic compounds: 50  $\mu\text{M}$   $\text{TbCl}_3$ , 50  $\mu\text{M}$  DHS, 50  $\mu\text{M}$  EB or 50  $\mu\text{g}$  DEAE-D. After an incubation at 30°C for 5 min, 100- $\mu\text{l}$  samples were withdrawn and filtered through a millipore filter (0.45  $\mu\text{m}$  mean pore size). Filters were washed twice with 20 mM KCl, dried in air and the radioactivity was measured in a Beckman LS6500 scintillation counter.  $^{86}\text{Rb}^+$  loss was determined as the difference between the control without cationic compound and those with the cationic compounds added.  $^{86}\text{Rb}^+$  content in the control remained unchanged after 30 min incubation.

### 2.10. Terbium binding determinations

Terbium binding determinations and maximal binding of terbium and dissociation constant estimations were made by measuring the free concentration of  $\text{Tb}^{3+}$  remaining after incubation of the cells as follows: 25 mg of fresh cells were placed in 5 ml of a medium containing 5 mM MES-TEA (pH 6.0) and different concentrations of terbium chloride, from 2  $\mu\text{M}$  to 30  $\mu\text{M}$ . Cells were incubated for 1 min and then centrifuged; the supernatant was used for terbium determinations. Terbium concentration was measured adding different aliquots of the supernatant to 20  $\mu\text{M}$  dipicolinic acid, in 5 mM MES-TEA (pH 6.0), in a final volume of 5.0 ml. Fluorescence was measured at 276–545 nm as the excitation and emission wavelengths, respectively. Fluorescence values were compared to a standard curve prepared with known concentrations of  $\text{TbCl}_3$ . The cation forms a fluorescent adduct with dipicolinic acid, and this property of the cation has been successfully used to measure its binding to biological molecules [19].

### 2.11. Data analysis

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

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

### 3. Results

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

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

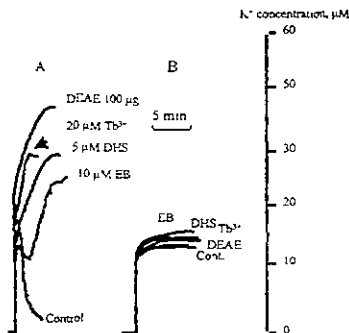


Fig. 1. Potassium efflux produced by different cationic agents, glucose requirement. Incubation conditions 2 mM MES-TEA buffer (pH 6.0), 10 mM glucose. Final volume was 100 ml 25 mg of yeast (wet weight) was added after a few seconds of incubation. In B, glucose was omitted.  $K^+$  concentration was followed with a  $K^+$ -selective cationic electrode.

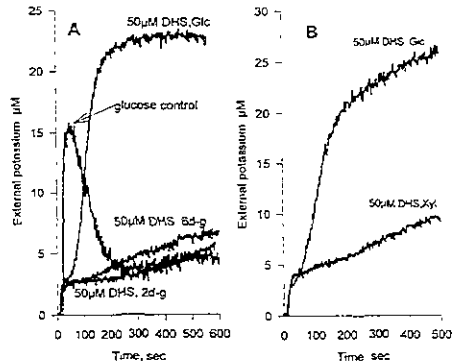


Fig. 2.  $K^+$  efflux produced by DHS with different substrates. Potassium efflux was determined with a potassium-selective electrode. Incubation medium: 10 mM glucose, 2 mM MES-TEA buffer (pH 6.0); final volume, 10.0 ml. Where indicated, 10 mM 2-deoxyglucose and 6-deoxyglucose (A) and 10 mM xylose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

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

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

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

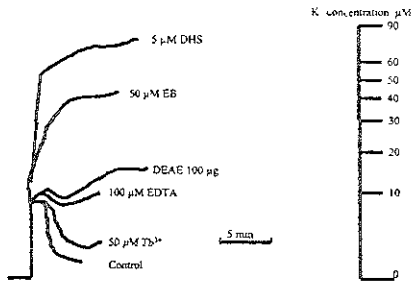


Fig. 3 Efflux of potassium produced by different cationic compounds in the presence of 100  $\mu\text{M}$  EDTA. Incubation medium 10 mM glucose, 2 mM MES-TEA buffer (pH 6.0), final volume, 10.0 ml

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

Table 1

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

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

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

From these results we could expect that if the negative cell surface charge was blocked, then no efflux of potassium would result by treatment of the cells with cationic compounds. Results of Table 2 are consistent with this view; if 1 mM  $\text{MgCl}_2$  was present at the same time as the cationic compound, less potassium efflux was promoted by the cationic compound. It is important to mention that 1 mM  $\text{MgCl}_2$  did not significantly affect potassium efflux or uptake in control experiments

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

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

Table 2

Effect of  $\text{MgCl}_2$  on  $\text{K}^+$  efflux produced by several cationic compounds

Treatment	Total efflux, nmol
Control	95 ± 23
1 mM $\text{MgCl}_2$	110 ± 32
50 $\mu\text{g}$ DEAE-D	260 ± 42
50 $\mu\text{g}$ DEAE-D, 1 mM $\text{MgCl}_2$	45 ± 12
50 $\mu\text{M}$ DHS	315 ± 45
50 $\mu\text{M}$ DHS, 1 mM $\text{MgCl}_2$	78 ± 23

$\text{K}^+$  efflux was measured by means of a potassium-selective electrode in a medium containing 25 mg (wet weight) of cells, 2 mM MES-TEA (pH 6.0), 10 mM glucose and where stated, 1 mM  $\text{MgCl}_2$  and the respective concentration of the cationic compound. Final volume was 10 ml



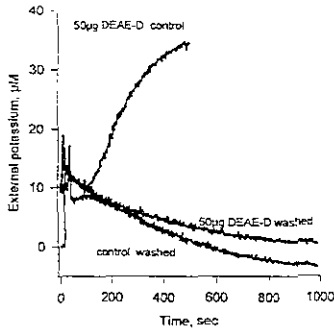


Fig. 4. Reversibility of the effect of DEAE-D by washing of the cells with  $MgCl_2$ . 50 mg (wet weight) of cells previously incubated with DEAE-D during 5 min were washed twice with 1 mM  $MgCl_2$  and then washed with distilled water, and used for potassium efflux determinations with a potassium-selective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

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

Table 3

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

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

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

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

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

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

Table 4

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

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

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

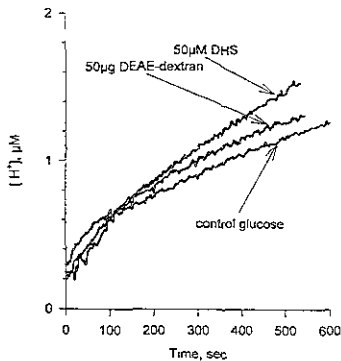


Fig. 5 Effects of DEAE-D and DHS on proton pumping by yeast.  $H^+$  concentration was continuously recorded with a pH electrode in a medium similar to that of Fig. 1, with 50 mg of fresh cells. Where indicated, 50  $\mu M$  DHS or 50  $\mu g$  DEAE-D was added to the medium.

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

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

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

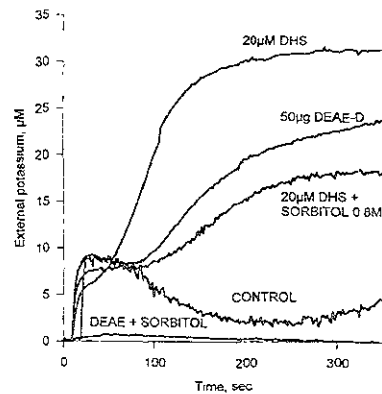


Fig. 6 Effects of 0.8 M sorbitol on potassium efflux produced by DEAE-D and DHS. Potassium efflux was followed continuously with a potassium-selective electrode in a medium and conditions similar to those of Fig. 1. Where indicated, 0.8 M sorbitol and/or 20  $\mu M$  DHS and 50  $\mu g$  of DEAE-D were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

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

Measurements of membrane potential using a fluorescent cyanine as a probe [17] showed no significant changes of this parameter using cationic compounds at concentrations of  $20\text{--}50 \mu\text{M}$  which promoted potassium efflux. Only concentrations of  $\text{TbCl}_3$  50-fold higher ( $2.5 \text{ mM}$ ) quenched  $28 \pm 3.3\%$  the fluorescence of the control; under similar conditions,  $2.5 \text{ mM}$  DHS only produced a decrease of  $11 \pm 5\%$ . DEAE-D used at the same concentration inducing potassium efflux ( $50 \mu\text{g}$ ) only quenched  $4\%$  of the fluorescence, compared with  $20 \text{ mM}$  of KCl that quenched  $16 \pm 3.9\%$  of the same control.

The efflux of potassium induced by cationic compounds showed a response depending on the cellular potassium concentration; when cell potassium decreased, a decreased efflux of potassium by DEAE-D and  $\text{TbCl}_3$  was observed (data not shown). Our results showed that at a cell  $\text{K}^+$  content of  $256 \text{ mM}$ , treating the cells for  $5 \text{ min}$  with  $100 \mu\text{g}$  of DEAE-D an efflux of  $11\%$  of the cell potassium was produced; when cellular potassium was  $116 \text{ mM}$ , no efflux of potassium could be measured. For  $100 \mu\text{M}$   $\text{TbCl}_3$ , with a cellular potassium concentration of  $215 \text{ mM}$ , an efflux of  $12\%$  was observed, and with a cellular potassium concentration of  $164 \text{ mM}$  no efflux of potassium was observed. With EB and DHS, the response was independent of the cellular potassium. With these agents, no changes in the efflux were found in relation to cell potassium: with  $100 \mu\text{M}$  DHS, for a cellular potassium of  $271$  and  $153 \text{ mM}$ ,  $16\%$  and  $13\%$  of efflux was produced, respectively

#### 4. Discussion

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

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

The experiments showed that binding of most of the cationic compounds to the negative surface charges of the cell was necessary for the phenomenon to occur, since some of the agents could be removed from the surface of the cell by washing with  $\text{MgCl}_2$ , showing that the efflux of potassium occurred at the level of the cell membrane. Our experiments also show that although a generalized increase of surface charge produced by EDTA favored the cationic compound binding, this is not, in all cases, a factor defining the efflux of potassium, since with DEAE-D, the presence of the chelator prevented its effect.

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

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

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

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

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

An additional finding of the experiments is that

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

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

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

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

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

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

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

#### Acknowledgements

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

#### References

- [1] A. Rothstein, M. Bruce, The potassium efflux and influx in yeast at different potassium concentrations, *J. Cell Comp. Physiol.* 51 (1958) 145–159.
- [2] A. Rothstein, M. Bruce, The efflux of potassium from yeast cells into a potassium free medium, *J. Cell. Comp. Physiol.* 51 (1958) 439–455.
- [3] A. Peña, J. Ramírez, An energy-dependent efflux for potassium ions in yeast, *Biochim. Biophys. Acta* 1068 (1991) 237–244.
- [4] A. Peña, M.A. Mora, N. Carrasco, Uptake and effects of several cationic dyes on yeast, *J. Membr. Biol.* 47 (1979) 261–284.
- [5] V. Huber-Wächtel, A. Wiemken, Differential extraction of soluble pools from the cytosol and the vacuoles of yeast (*Candida utilis*) using DEAE-dextran, *Arch. Microbiol.* 120 (1979) 141–149.
- [6] M.C. Gustin, X.L. Zhou, B. Martinac, Cn. Kung, A mechanosensitive ion channel in the yeast plasma membrane, *Science* 242 (1988) 762–765.
- [7] A. Bertl, C.L. Slayman, Complex modulation of cation channels in the tonoplast and plasma membrane of *Saccharomyces cerevisiae*: single-channel studies, *J. Exp. Biol.* 172 (1992) 271–287.
- [8] K.A. Ketchum, W.J. Joiner, A.J. Sellers, L.K. Kaczmarek, S.A.N. Goldstein, A new family of outwardly rectifying potassium channel proteins with two pore domains in tandem, *Nature* 376 (1995) 690–695.
- [9] J.D. Reid, W. Lukas, R. Shafaatian, A. Bertl, C. Scheurmann-Kettner, H.R. Guy, A. North, The *S. cerevisiae* outwardly-rectifying potassium channel (DUK1) identifies a new family of channels with duplicated pore domains, *Receptors Channels* 4 (1996) 51–62.
- [10] F. Lesage, E. Guillemare, M. Fink, F. Duprat, M. Lazdunski, G. Romey, J. Barhanin, A pH-sensitive yeast outward rectifier  $K^+$  channel with two pore domains and novel gating properties, *J. Biol. Chem.* 271, (8) (1996) 4183–4187.
- [11] X.L. Zhou, B. Vailliant, S.H. Loukin, Ch. Kung, Y. Saami, YKC1 encodes the depolarization-activated  $K^+$  channel in the plasma membrane of yeast, *FEBS Lett.* 373 (1995) 170–176.
- [12] J. Ramirez, A. Peña, M. Montero-Lomeli,  $H^+/K^+$  exchange in reconstituted yeast plasma membrane vesicles, *Biochim. Biophys. Acta* 1285 (1996) 175–182.
- [13] C. Camarasa, S. Prieto, R. Ros, J.M. Salmon, P. Barre, Evidence for a selective and electroneutral  $K^+/H^+$ -exchange in *Saccharomyces cerevisiae* using plasma membrane vesicles, *Yeast* 12 (1996) 1301–1313.
- [14] T. Miosga, A. Witzel, F.K. Zimmermann, Sequence and Function Analysis of a 9.46 kb fragment of *Saccharomyces cerevisiae* chromosome X, *Yeast* 10 (1994) 965–973.
- [15] B. André, An overview of membrane transport proteins in *Saccharomyces cerevisiae*, *Yeast* 11 (1995) 1575–1611.
- [16] A. Peña, J. Ramirez, G. Rosas, M. Calahorra, Proton pumping and the internal pH of yeast cells, measured with pyranine introduced by electroporation, *J. Bacteriol.* 177, (4) (1995) 1017–1022.
- [17] A. Peña, S. Uribe, J.P. Pardo, M. Borbolla, The use of a cyanine dye in measuring membrane potential in yeast, *Arch. Biochem. Biophys.* 231, (1) (1984) 217–225.
- [18] A.P.R. Theuvsen, W.M.H. van de Wyngaard, J.W. van de Rijke, G.W.F.H. Borst-Pauwels, Application of 9-aminoacridine as a probe of the surface potential experienced by cation transporters in the plasma membrane of yeast cells, *Biochim. Biophys. Acta* 775 (1984) 161–168.
- [19] T.D. Barela, A.D. Sherry, A simple, one-step fluorometric method for determination of nanomolar concentrations of terbium, *Anal. Biochem.* 71 (1976) 351–357.
- [20] J.G.R. Elferink, H.L. Booij, The action of some triphenylmethane dyes on yeast and erythrocyte membranes, *Arzneim. Forsch.* 25 (1975) 1248–1252.
- [21] A. Peña, M. Borbolla, S. Uribe, N. Carrasco, S.M. Clemente, The Effects of Alkylguanidines on Monovalent Cation

Transport in Yeast Proceedings of the Vth International Symposium on Yeast, Pergamon Press, 1981, pp 485-489

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

## Effects of Weak Acids on Cation Accumulation, $\Delta\mu\text{H}$ and $\Delta\Psi$ in Yeast

RUTH LÓPEZ<sup>1</sup>, EMANUEL ENRIQUEZ<sup>1</sup> AND ANTONIO PEÑA<sup>1\*</sup>

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

With glucose as carbon source, as reported by other authors (Conway *et al.*, 1950), yeast cells accumulated large amounts of  $\text{CO}_2$ , carbonic acid, bicarbonate and  $\text{K}^+$  than when grown with ethanol. The addition of propionic acid to the cells produced an increase in the potassium ion accumulation when cells were incubated with ethanol as substrate, but not when incubated with glucose. In disagreement with Ryan *et al.* (1971) and Ryan and Ryan (1972), the internal pH of the cells with ethanol was lower than with glucose, eliminating this factor as the limiting factor for potassium accumulation. When the membrane potential difference was estimated, it was found that it was higher with glucose as substrate than with ethanol. In addition, with ethanol the addition of propionic acid produced an increase of the membrane potential, in agreement with the idea of an accumulation of the anions of monoprotic acids, which, being not diffusible, increase the negative membrane potential inside, which can drive the accumulation of larger amounts of monovalent cations. It was also found that the addition of propionic acid to cells incubated with glucose as substrate produced an efflux of  $\text{CO}_2$  from the cells, so that an exchange of the acid appears to take place. Copyright © 1999 John Wiley & Sons, Ltd.

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

### INTRODUCTION

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

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

Ryan *et al.* (1971) reported that the addition of organic acids, acetate or propionate or the bubbling of  $\text{CO}_2$  increases the accumulation of  $\text{K}^+$  with ethanol as substrate. This phenomenon was reproduced by Peña (1975). These results were explained by Ryan and Ryan (1972) as a result of the compensation of the alkalinization produced by the transport of  $\text{K}^+$  resulting from the increased proton pumping by the cells observed in the presence of the cation. It was suggested that the

\*Correspondence to: A. Peña, Departamento de Genética y Biología Molecular, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado 70-600, 04510 México DF, México. E-mail: apd@ifsioi.uran.mx.  
Contract/grant sponsor: Dirección General de Asuntos del Personal Académico, Universidad Nacional Autónoma de México; Contract/grant numbers: IN-202193, IN-207696.  
Contract/grant sponsor: Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, México; Contract/grant number: 3188N-9307.

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

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

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

## MATERIALS AND METHODS

### *Yeast and growth conditions*

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

### *Ion accumulation experiments*

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

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

### *CO<sub>2</sub> measurements*

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

### *Measurement of potassium content*

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

### *Distribution of radioactive propionic acid*

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

### *Estimation of the membrane potential*

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

### *Measurement of the internal pH*

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



Table 1 CO<sub>2</sub> (mm) accumulated at different values of the external pH, with glucose or ethanol as substrates, with or without the addition of KCl.

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

100 mg of cells were incubated in 5 ml of a medium containing 100 mM glucose without shaking, or 8.6 mM ethanol, shaking in a 25 ml Erlenmeyer flask, 30 mM KCl (when indicated). The media were buffered with 10 mM triethanolamine (TEA) adjusted to pH 7.5 with tartaric acid, or 10 mM tartaric acid adjusted with TEA to pH 4.5. The cells were incubated for 15 min at 30°C in a controlled temperature water bath. After incubation the suspension was centrifuged and the supernatant and/or the pellet were used for the measurement of CO<sub>2</sub>. When indicated, 10 mM propionic acid, adjusted to the desired pH were added. Standard deviation was less than 10% in seven separate experiments in duplicate. Values in parentheses indicate the percentage increases in CO<sub>2</sub> concentration with K<sup>+</sup>.

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

#### External pH measurements

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

#### Carbonic anhydrase measurements

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

with a constant flow of CO<sub>2</sub> was added, and the colour change was followed at 620 nm. As a positive control of the method, an extract of erythrocytes was also used. Final volume was 2.0 ml under constant stirring at 30°C.

## RESULTS

The measurement of ionic contents and other parameters was performed after an incubation of 15 min, when the cells had reached a steady state and no further important net changes could be detected in ion accumulation. Table 1 shows, as expected, that the total CO<sub>2</sub> content of the cells incubated in the presence of glucose was higher than that with ethanol as substrate. These results are in agreement with those reported previously by Conway and Downey (1950) and Peña *et al.* (1969). Also, with glucose as substrate, when the pH was increased, CO<sub>2</sub> accumulation increased, with ethanol, by contrast, this accumulation showed a slight decrease at the high pH. The presence of potassium had similar effects, increasing the CO<sub>2</sub> concentration at both pH values, in spite of the fact that it does not stimulate fermentation or respiration at high pH values (Rothstein and Demis, 1953; Peña *et al.*, 1972). The percentage increase in the accumulation of CO<sub>2</sub> (around 30%) was similar at both pH values; however, the increase in absolute values was higher when the substrate was glucose than with ethanol.

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

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

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

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

As shown in Tables 1 and 2, the intracellular content of  $\text{CO}_2$ , increased both with glucose and ethanol in the same direction as  $K^+$ . However, quantitatively, the potassium ion increases were higher. It was considered important to define the internal pH values, in order to correlate them with the distribution of  $\text{CO}_2$ , the results are shown in Table 3. It is important to stress that with the method used (Peña *et al.*, 1995), the cytoplasmic pH was measured.

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

the former generates high concentrations of  $\text{CO}_2$  and consequently carbonic acid from it. Also, when the internal pH values of the cells were calculated from the distribution of carbonic acid/bicarbonate (Table 4), higher values were obtained than those measured by the fluorescence changes of pyranine. This fact already indicates that the distribution of this important pair of substrates implies additional factors (see below).

Yeast cells during fermentation notably acidify the medium (Conway and O'Malley, 1946); this is partly due to the production of  $\text{H}_2\text{CO}_3$ , but also to the pumping of protons from the cell interior by the  $\text{H}^+$ -ATPase, or by the expulsion of other organic acids; for this reason it was decided also to measure the changes of the external pH. Table 5

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

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

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

Table 4. Values of the internal pH of yeast obtained from the distribution of H<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> and bicarbonate, according to the internal and external pH values of the cell.

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

100 mg of cells were incubated in 5 ml of a medium containing 100 mM glucose without shaking, or 8.6 mM ethanol, shaking in a 25 ml Erlenmeyer flask, 30 mM KCl (when indicated). The media were buffered with 10 mM triethanolamine (TEA) adjusted to pH 7.5 with tartaric acid, or 10 mM tartaric acid adjusted with TEA to pH 4.5. The cells were incubated for 15 min at 30°C in a controlled temperature water bath. After incubation the suspension was centrifuged and the supernatant and/or the pellet were used for the measurement of CO<sub>2</sub> and of the external pH to calculate the distribution of H<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> and HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> inside the cells, and from there, the internal pH by means of the Henderson Hasselbalch equation. 6.35 was taken as the value for the pK of carbonic acid. The results were obtained from the data of Figures 1 and 5.

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

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

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

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

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

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

100 mg of cells were incubated as described for Table 1 during 10 min. in the presence of 30 mM KCl and then 10 mM of propionic acid was added, continuing the incubation for another 10 min. Then the cells were centrifuged and their internal CO<sub>2</sub> concentration was measured as described under Methods. Results are the mean of two different experiments.

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

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

Since the cells incubated with glucose as substrate have a much higher content of CO<sub>2</sub>, and the addition of propionate with this substrate did not increase their K<sup>+</sup> content, it was decided to study the effect of propionic acid on the concentration of

Table 7. Effects of propionic acid on the CO<sub>2</sub> (mM) accumulated by cells with glucose or ethanol as substrates at both pH values of the medium.

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

100 mg of cells were incubated as described for Table 1 for 10 min with 30 mM KCl, and then 10 mM of propionic acid was added, continuing the incubation for another 10 min. Then the cells were centrifuged and their internal CO<sub>2</sub> concentration was measured as described under Methods. Results are the mean of two different experiments.

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

Initial pH	4.5	4.5 plus K <sup>+</sup>	7.5	7.5 plus K <sup>+</sup>
Glucose	19	22	19	23
Ethanol	21	25	20	22

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

CO<sub>2</sub> in the cells incubated with glucose or ethanol at both pH values of the medium, expecting that propionate would substitute for carbonic acid-bicarbonate. In fact, the addition of the acid produced a decrease of the total CO<sub>2</sub> accumulated, which was significantly higher when the substrate was glucose (Table 7). On the other hand, <sup>14</sup>C-propionic acid accumulated similarly with glucose or ethanol as substrates (Table 8).

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

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

## DISCUSSION

### Accumulation of K<sup>+</sup> at both pH values

The data presented are in general agreement with those of former authors. However, although the increases of bicarbonate and of K<sup>+</sup> are in the same direction, the coincidence was not stoichiometric. Calculation of the bicarbonate concentrations from the data of Table 1, after subtraction of the dissolved CO<sub>2</sub> produced the results shown in Table 4. Conway and Brady (1950) stated that there is a direct relation between the bicarbonate and K<sup>+</sup> accumulation, and this did not hold for our experimental conditions. Quantitatively, our data are more in agreement with the statement of Ryan *et al.* (1971) and Ryan and Ryan (1972), who postulated an indirect relation, according to them depending on the values of the internal pH as the limiting factor for the accumulation of the cation. However, our remaining results indicate that there are other factors involved in this phenomenon.

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

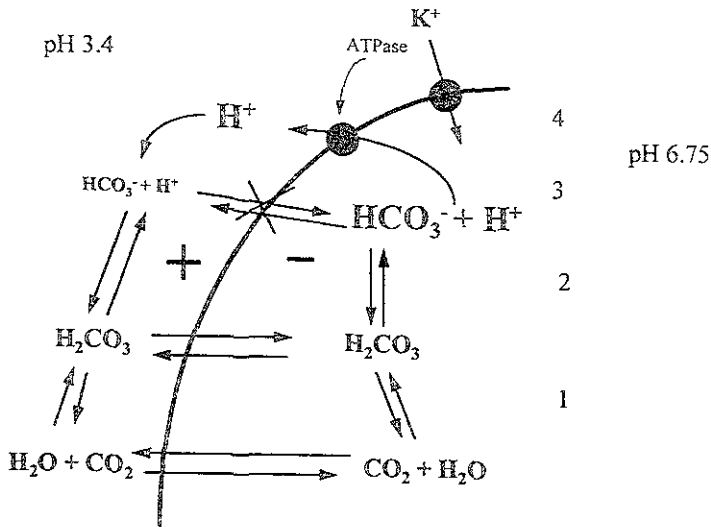


Figure 1. Scheme representing the Donnan effect. On the assumption that decarboxylation reactions produce  $CO_2$ , this is spontaneously hydrated to  $H_2CO_3$  (1), which then dissociates into bicarbonate and one proton (2), the proton is expelled by the  $H^+$ -ATPase of the plasma membrane (3), which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

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

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

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

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

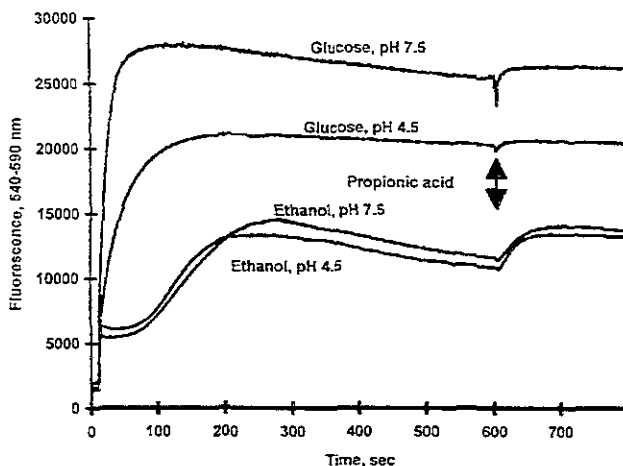


Figure 2. Changes of the membrane potential produced by the addition of propionic acid to cells incubated with glucose or ethanol as substrates. 25 mg of cells were added to the following medium: 100 mM glucose or 8.6 mM ethanol; 10 mM triethanolamine adjusted to pH 7.5 with tartaric acid, or 10 mM tartaric acid adjusted to pH 4.5 with triethanolamine, 10  $\mu$ M pentachlorophenol, 10  $\mu$ M  $\text{CaCl}_2$  (Peña *et al.*, 1984). Final volume was 2.0 ml, temperature 30°C. Where indicated, 10 mM propionic acid was added.

internal pH values reached during metabolism, the formation of the anion  $\text{HCO}_3^-$  is favoured in different degrees. It is possible that the accumulation of this anion in large amounts may favour the accumulation of  $\text{K}^+$  by generating a concentration gradient of a non-diffusible negative charge, according to a Donnan equilibrium. This phenomenon appears to be more important at the low values of the external pH, when the ratio of internal to external bicarbonate concentrations reached higher values. It is possible that by this mechanism of passive accumulation of a non-diffusible anion, yeast may indirectly use the pH gradient without the need of a  $\text{H}^+/\text{K}^+$  symporter such as that found in *Neurospora* (Rodríguez-Navarro *et al.*, 1986). This same explanation can be given to the increased accumulation of  $\text{K}^+$  when the cells were incubated with ethanol as substrate and propionic acid was added to the medium. The experimental proof for this assumption was obtained by the estimation of the membrane potential of the cells and the changes produced by the addition of propionic acid, both with glucose or ethanol as substrates. In fact, when the latter was the substrate, upon the addition of

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

There is still another consideration to the data, referring to the higher value of the internal pH observed with glucose as substrate, in spite of the fact that with this substrate high amounts of  $\text{CO}_2$  are produced, which can be hydrated to carbonic acid, dissociating then to  $\text{HCO}_3^-$  plus  $\text{H}^+$ . There are other factors which can be invoked to explain this phenomenon, one of which is the stimulation of the  $\text{H}^+$ -ATPase produced by glucose (Serrano, 1983). Also, at the high pH values of the medium, the ATPase is stimulated, even in the absence of  $\text{K}^+$  (Peña *et al.*, 1972). This stimulation of the ATPase was also observed by incubating the cells at low pH values with glucose (Eraso and Gancedo, 1987).

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

means of electroporated pyranine indicate that this method is accurate enough to measure internal pH, producing results in accordance to different methods (Peña *et al.*, 1995, Calahorra *et al.*, 1998, Preston *et al.*, 1989; Haworth and Fliegel, 1993; Höfer *et al.*, 1996). Moreover, the calculations for the internal pH under extreme conditions (in the presence of  $K^+$ , and at an initial external pH of 7.5 produced by this method an internal pH close to 9, which appears to be unacceptable, by its value itself, and also because of the disagreement with the results of the above mentioned authors. If this is accepted, it appears that there are other factors involved in the accumulation of bicarbonate within the cell, and not only the distribution of both carbonic acid and bicarbonate by the free diffusion of  $CO_2$  and carbonic acid, according to the relative values of the pH in the different cellular compartments. It should be pointed out that the distribution of bicarbonate and carbonic acid between the cytoplasm and the vacuole according to their pH values, in any case, should be the opposite to what was observed, since the latter compartment is more acidic. One possible explanation for this finding could be that of a retention mechanism for bicarbonate within the cells, perhaps considering the vacuole as the main candidate for bicarbonate accumulation, because of its size and inverted membrane potential, positive inside. However, this phenomenon deserves further exploration.

#### ACKNOWLEDGEMENTS

This work was partially supported by Grants Nos IN-202193 and IN-207696 from the Dirección General de Asuntos del Personal Académico of this University, and No 3188N-X9307 from the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología of México

#### REFERENCES

- Blatt, M. R., Rodríguez-Navarro, A. and Slayman, C. L. (1987) Potassium-proton symport in *Neurospora*: kinetic control by pH and membrane potential. *J. Membr. Biol.* **98**, 169–189.
- Calahorra, M., Martínez, G. I. A., Hernández-Cruz, A. and Peña, A. (1998). Values of yeast cytoplasmic and vacuolar pH: the influence of monovalent cations. *Yeast* **14**, 505–515.
- Conway, E. J. and Brady, T. G. (1950) Biological production of acid and alkali. I. Quantitative relations of succinic and carbonic acids to the potassium and hydrogen ion exchange in fermenting yeast. *Biochem. J.* **47**, 360–369.
- Conway, E. J., Brady, T. G. and Carton, E. (1950). Biological production of acid and alkali. II. A redox theory for the process in yeast with application to the production of gastric acidity. *Biochem. J.* **47**, 369–374.
- Conway, E. J. and Downey, M. (1950) pH values of the yeast cell. *Biochem. J.* **47**, 355–360.
- Conway, E. J. and O'Malley, E. (1946). The nature of the cation exchanges during yeast fermentation, with formation of 0.02 N-H ion. *Biochem. J.* **40**, 59–67.
- Cooper, T. G., Tchen, T. T., Wood, H. G. and Benedict, C. R. (1968). The carboxylation of phosphoenolpyruvate and pyruvate. I. The active species of  $CO_2$  utilized by phosphoenolpyruvate carboxylase, carboxytransphosphorylase and pyruvate carboxylase. *J. Biol. Chem.* **243**, 3857–3863.
- Eraso, P. and Gancedo, C. (1987). Activation of yeast plasma membrane ATPase by acid pH during growth. *FEBS Lett.* **224**, 187–192.
- Funayama, S., Gancedo, J. M. and Gancedo, C. (1980). Turnover of yeast fructose-bisphosphatase in different metabolic conditions. *Eur. J. Biochem.* **109**, 61–66.
- Haworth, R. S. and Fliegel, L. (1993). Intracellular pH in *Schizosaccharomyces pombe*—comparison with *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biochem.* **124**, 131–140.
- Höfer, M., Calahorra, M. and Peña, A. (1996). Assessment of  $\Delta\mu_{H^+}$  in *Schizosaccharomyces pombe*, intracellular inclusion of impermeable agents by electroporation. *Folia Microbiol.* **41**, 98–100.
- Krebs, H. A. and Roughton, F. J. W. (1948). Carbonic anhydrase as a tool in studying the mechanism of reactions involving  $H_2CO_3$ ,  $CO_2$  or  $HCO_3^-$ . *Biochem. J.* **43**, 550–555.
- Peña, A. (1975). Studies on the mechanism of  $K^+$  transport in yeast. *Arch. Biochem. Biophys.* **167**, 397–407.
- Peña, A., Cinco, G., Gómez-Puyou, A. and Tuena, M. (1969) Studies on the mechanism of stimulation of glycolysis and respiration by  $K^+$  in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim. Biophys. Acta* **180**, 1–8.
- Peña, A., Cinco, G., Gómez-Puyou, A. and Tuena, M. (1972) Effects of the pH of the incubation medium on glycolysis and respiration in *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch. Biochem. Biophys.* **153**, 413–425.
- Peña, A., Ramírez, J., Rosas, G. and Calahorra, M. (1995). Proton pumping and the internal pH of yeast cells, measured with pyranine introduced by electroporation. *J. Bacteriol.* **177**, 1017–1022.
- Peña, A., Uribe, S., Pardo, J. P. and Borbolla, M. (1984). The use of a cyanine dye in measuring membrane potential in yeast. *Arch. Biochem. Biophys.* **231**, 217–225.
- Preston, R. A., Murphy, R. F. and Jones, E. W. (1989). Assay of vacuolar pH in yeast and identification of acidification-defective mutants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**, 7027–7031.

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