



El Transporte de Potasio en la Levadura

RUTH LÓPEZ* Y ANTONIO PEÑA

Departamento de Genética y Biología Molecular, Instituto de Fisiología celular, UNAM. Apartado 70-600. 04510 México D. F. México. Tel. (5) 622-56-33. Fax (5) 622-56-30

*Autor para correspondencia E-mail: ruthl@ifisiol.unam.mx

ABSTRACT: K^+ transport is vital for all cells. The first model to explain K^+ transport in yeast was a redox potential driven H^+/K^+ antiporter. Later, a H^+ -ATPase was described which generates a H^+ gradient, acid outside. This proton gradient is used by a secondary transporter, which transports K^+ to the inside. These transporters are separate proteins, that have been isolated and their genes have been cloned. Furthermore, in *Saccharomyces cerevisiae* two different K^+ transporters have been described. K^+ exit occurs through K^+ channels and through H^+/K^+ antiporters that seem to participate in the regulation of internal pH. In addition, yeast produces a large amount of CO_2 during the fermentation process. CO_2 accumulation in turn results in the establishment of a Donnan potential due to the accumulation of bicarbonate, which retains large quantities of K^+ . In *S. cerevisiae*, bicarbonate is responsible for a large accumulation of K^+ . Also, the H^+ -ATPase, by pumping protons to the outside, favors the formation of bicarbonate which cannot diffuse to the extracellular environment leading to cytoplasmic pH values near 7.0. Bicarbonate accumulation allows yeast to maintain large pH gradients across the plasma membrane.

Key words: K^+ transport, *Saccharomyces cerevisiae*.

RESUMEN. El transporte del ion potasio es fundamental para todas las células. En la levadura se describió primero como un intercambiador H^+/K^+ impulsado por el potencial redox de las células. Sin embargo, posteriormente se definió que hay una ATPasa que bombea protones y genera un potencial electroquímico que impulsa al K^+ al interior por un transportador diferente. Se ha demostrado, mediante el aislamiento de la ATPasa y del transportador, que los sistemas funcionan por separado. Además, se clonaron ya los genes de ambos sistemas. De hecho, en *Saccharomyces cerevisiae* existen dos acarreadores. Hay también canales iónicos que permiten la salida del K^+ de la levadura, así como varios intercambiadores H^+/K^+ , que parecen tener una gran importancia para la regulación de su pH interno. Hay también un potencial Donnan, generado por la acumulación de bicarbonato, que en especial en *S. cerevisiae* produce grandes cantidades de CO_2 , juega un papel importante en la acumulación de K^+ . La actividad de la ATPasa de membrana plasmática, que bombea protones al exterior, permite retener la forma ionizada del ácido carbónico, el bicarbonato, el cual no puede difundir al exterior. La acumulación del bicarbonato genera un potencial de Donnan negativo en el interior, que permite la acumulación de cantidades adicionales de K^+ . Este mecanismo, además explica por qué esta levadura, que produce grandes cantidades de CO_2 , que al hidratarse se convierte en H_2CO_3 , puede alcanzar valores de pH citoplásmico cercanos a 7. Por otro lado, permite mantener un gradiente de protones muy grande a través de la membrana plasmática y aprovecharlo de manera indirecta en la acumulación de K^+ .

Palabras clave: transporte de K^+ , *Saccharomyces cerevisiae*.

Introducción

Antecedentes sobre el estudio del transporte de K^+

Las células requieren potasio y lo acumulan en el interior para diversas funciones. Probablemente fue la levadura, el organismo en el cual se realizaron los primeros estudios formales sobre el transporte de iones, en especial del pota-

sio. Desde 1946, el grupo de Conway²⁷ realizó estudios orientados a elucidar el mecanismo de transporte de potasio en la levadura; observó una relación prácticamente estequiométrica de 1:1 entre la entrada de potasio y la acidificación del medio durante el proceso de fermentación. Esto llevó al mismo grupo²⁴ a postular que la entrada de potasio y otros iones a la célula se llevaba a cabo preferentemente por un sistema de transporte o acarreador fisiológico

Abreviaturas: *TRK1*, gen que codifica para el sistema de transporte de K^+ de alta afinidad; *TRK2*, gen que codifica para el sistema de transporte de K^+ de baja afinidad; *PMAT*, gen que codifica para la ATPasa de membrana plasmática; *KAT1*, *TOK1*, gen que codifica para un canal rectificador entrante de K^+ ; $\Delta\mu_H^+$, potencial electroquímico de protones; DCCD, diclorohexilcarbodiimida; DNP, 2,4-dinitrofenol; ΔpH , gradiente de pH; $\Delta\psi$, potencial de membrana; TTP⁺, tetrafenilfosfonio; pH_i , pH interno; pH_o , pH externo; K_m , constante de afinidad; V_{max} , velocidad máxima; pK_a , constante de ionización de ácido débil.



de K^+ , y se propuso una "bomba" que podía funcionar al mismo tiempo como una bomba de protones, produciendo el intercambio de K^+ por H^+ , mediante un mecanismo eléctricamente neutro, impulsado por el potencial redox de la célula.^{24,25} Este es un proceso importante, no sólo para la célula, sino también desde el punto de vista industrial; en especial *Saccharomyces cerevisiae*, al entrar en contacto con el medio en que se encuentre, en particular en condiciones de anaerobiosis, tiene la capacidad de acidificarlo fuertemente, lo cual le permite instalarse en él, impidiendo el establecimiento de otros microorganismos. Además, el enorme gradiente de protones que las levaduras pueden generar les permite transportar otros materiales nutritivos como azúcares y aminoácidos.³⁴

Mediante experimentos de transporte y consideraciones cinéticas, aplicando la ecuación de Michaelis, la célula en la que por primera vez se demostró la presencia de un acarreador fue la levadura.^{28,87} Para dicho sistema de transporte, Conway²⁵ plantea como hipótesis la existencia de un acoplamiento del movimiento de los protones y el K^+ , efectuado a expensas de la energía libre de las reacciones de óxido-reducción del metabolismo celular, mismo que ocurría contra un gradiente de concentración. No obstante que después se definió que el sistema está impulsado por una bomba de protones,^{66,67} esta propuesta fue uno de los antecedentes importantes para el planteamiento, en las mitocondrias y en las bacterias, de la teoría de Mitchell.⁵⁶

Rothstein y Demis (1953)⁸⁶ descubrieron que la fermentación de la levadura se estimulaba por la presencia de potasio en el medio extracelular. Sus datos fueron verificados por Peña y col.⁶⁴ (1967), pero los autores encontraron que además del proceso de fermentación, la adición de K^+ también estimulaba la respiración. La investigación se encaminó a localizar las reacciones de la glucólisis responsables de la activación de la ruta metabólica en presencia de potasio; al analizar algunos intermediarios importantes de la glucólisis no encontraron factores de regulación importantes que confirmaran que el poder reductor de las células fuera la fuerza motriz para el transporte de potasio. Este mismo grupo⁶⁵ encontró que la adición de potasio a la levadura producía variaciones notables en los niveles de los nucleótidos de adenina, postulando que la estimulación de la glucólisis y la respiración por el potasio se explicaba sobre la base de la disminución en la concentración de ATP, pero fundamentalmente por el aumento del ADP, tal vez el principal factor en la regulación de la velocidad de esta vía. Esto llevó a pensar que el gasto de ATP podía ser una consecuencia de los requerimientos del sistema de transporte de potasio, o que la presencia del ion dentro de la célula o alguna consecuencia de ello, inducía los cambios necesarios para producir la estimulación de la actividad de una ATPasa.⁶⁵

En otros experimentos, Peña y col.⁶⁶, observaron que el pH alcalino del medio sin K^+ , también ejercía la estimulación de ambos procesos celulares (fermentación y respiración), y que ésto se acompañaba de una salida rápida de

H^+ , y también, que esta salida de H^+ se aceleraba al agregar K^+ , pero sólo cuando el pH del medio era bajo.

Siguiendo los planteamientos de Mitchell para las bacterias y mitocondrias,⁵⁶ estos resultados permitieron plantear varias hipótesis

- Es el ATP y no el poder reductor de la célula el que se utiliza como fuerza impulsora para la salida activa de protones.
- Esta salida de protones genera un potencial transmembranal, negativo en el interior de la célula.
- La entrada del potasio se realiza impulsada por este potencial negativo interno.
- El bombeo de los protones y la entrada del K^+ ocurren por dos acarreadores diferentes; y
- La salida de aniones balancea la de H^+ cuando el pH es alto (7.5), de acuerdo con los experimentos de Conway y Brady.²⁵

Slayman y col.¹⁰¹ estudiaron en *Neurospora crassa* el efecto del pH extracelular sobre el transporte de cationes y también sugirieron que la entrada de K^+ y la salida de H^+ se podían explicar en términos de la existencia de una bomba de protones.

Para demostrar que el sistema del transporte del K^+ implicaba dos sistemas, una ATPasa de protones y un acarreador del catión, se usaron inhibidores del transporte que no afectan a la ATPasa. Pressman⁷¹ y Chapell²² reportaron que varios derivados de guanidinas actuaban como inhibidores del metabolismo mitocondrial. Además, se describió que existe cierta afinidad de la guanidina por el canal de Na^+ en células nerviosas.⁴⁴ Para tratar de establecer la relación entre los flujos de K^+ y H^+ a través de la membrana plasmática de levaduras, el grupo de Peña (1973), realizó estudios con diversos inhibidores, entre los cuales se utilizaron las alquilguanidinas⁶¹ y algunos colorantes.⁶³

Peña⁶¹ encontró que las alquilguanidinas, inhibían el transporte de K^+ competitivamente sin alterar la salida de protones, efecto que a su vez, encontró de manera más clara con bromuro de etidio,⁶⁷ permitiendo separar la actividad de bombeo de protones de la del transporte de potasio.

La cinética de los sistemas de transporte del K^+ .

Los estudios cinéticos que se han realizado sobre el transporte indican que se trata de un sistema complejo, porque varios factores importantes como el potencial de membrana, el pH del medio, etc., lo influyen directamente. Conway y Duggan²⁸ y Rothstein y Bruce,⁸⁷ demostraron que el transporte de K^+ se comporta según una cinética del tipo Michaelis-Menten, lo cual puede indicar que está involucrado un sistema de transporte unisítio. Posteriormente, Armstrong y Rothstein^{3,4} señalaron la participación de diferentes factores sobre el sistema acarreador, al medir desviaciones a la cinética de Michaelis-Menten en el transporte de K^+ por la influencia de otros iones en el medio de incubación, además de existir competencia entre el K^+ y los H^+ ³ y proponer la existencia de diferencias en especifi-

cidad del sistema y comportamiento cinético en la cara interna y externa de la membrana celular.⁸⁸

Borst-Pauwels y col.¹¹ encontraron que había estimulación del transporte de cationes monovalentes por influencia de otros iones en el medio de incubación, pero a concentraciones muy pequeñas. Borst-Pauwels,¹² al igual que Slayman,¹⁰² propusieron un modelo de transporte a través de un acarreador multisitio para explicar los resultados que presenta el transporte a pH bajo y alto.³ Estos autores consideran que en el acarreador los protones no sólo se unen a un sitio para el sustrato, sino también a un segundo sitio llamado modificador (sin función de transporte), los cuales pueden ser reemplazados por el catión sustrato (potasio) o por otros cationes al aumentar su concentración en el medio, siendo esto la razón que provoca desviaciones a las curvas de Michaelis. Posteriormente, se propuso un tercer sitio involucrado al que denominan sitio activador, el cual se manifiesta por el aumento del transporte de ⁸⁶Rb, por el efecto que algunos cationes ejercen a concentraciones relativamente bajas.^{11,32} Además, estos autores también demostraron que existe afinidad de otros cationes por el mismo sistema transportador; empero, las diferencias grandes entre algunos reportes, que se encuentran para ciertos cationes como Cs⁺, Rb⁺ y K⁺, pueden deberse a diferencias en las propiedades de la levadura.¹⁵

En 1984, Rodríguez-Navarro y Ramos^{76,81} encontraron que la cinética del transporte puede variar significativamente dependiendo de las condiciones de crecimiento y ensayo. En un sistema con células en crecimiento, la situación es más compleja, porque se manifiesta un sistema complejo con dos sitios de interacción o dos sistemas de transporte diferentes,^{75,82} uno de baja afinidad que se expresa en levaduras cultivadas a concentraciones relativamente altas de K⁺, con una K_m de 2 mM, y otro de alta afinidad con K_m 20 µM, que se presenta cuando la concentración de K⁺ en el medio de crecimiento se reduce a 5 µM. Estos sistemas de transporte no sólo difieren en su cinética, sino también en su dependencia del pH, sensibilidad a desacoplantes, respuesta a cambios del ATP y en su dependencia de la temperatura. Además, los datos sugieren que el acarreador de baja afinidad se convierte en, o se reemplaza por el de alta afinidad, pero no coexisten durante el crecimiento limitado por K⁺.

Según los resultados cinéticos con mutantes de levadura,⁷⁶ estos dos posibles sistemas de transporte de potasio se regulan por transinhibición del contenido de K⁺ interno, y por conversión a un estado de alta afinidad en condiciones de ayuno de K⁺ dependiente de energía.

La clonación de los sistemas de transporte de la levadura.

Gaber,³⁷ continuando en la misma dirección, mediante experimentos de genética molecular, aclararon sin duda que el sistema de transporte de potasio es independiente de la ATPasa de protones y se trata de dos sistemas diferentes.

La identificación de los genes *TRK1*, requerido para el transporte de alta afinidad para potasio³⁷ y el *PMA1* de la ATPasa de la membrana plasmática⁹⁶ demostraron que son codificados por loci no relacionados, ya que la mutación del *TRK1* le confiere un defecto significativo en el transporte de potasio de alta afinidad y no en el bombeo de protones ni en el transporte de potasio de baja afinidad. Posteriormente, se clonó también el gen *TRK2*.⁵¹ Resultados semejantes fueron obtenidos previamente por Brunner¹⁵ en una mutante de *Kluyveromyces lactis* en la cual se produjo un defecto en el transporte de potasio sin afectar el bombeo de protones. Se ha logrado clonar y secuenciar también este gen, del cual, en *K. lactis*, curiosamente, sólo existe una copia (Peña y col., comunicación personal).

Otros sistemas de transporte para el K⁺.

En *N. crassa*, Blatt y col.⁹ describieron que el potasio se cotransporta con protones en una relación 1:1 (simportador); este mecanismo permite aprovechar el gradiente electroquímico creado por la bomba de protones y para sostener el gradiente de potasio a través de la membrana del hongo. En *Saccharomyces cerevisiae* se ha intentado encontrar dicho cotransporte sin ningún éxito, a pesar del que postuló Boxman.¹⁴

El grupo de Kung³⁹ realizó estudios electrofisiológicos en levaduras y encontró canales iónicos dependientes de voltaje en la membrana plasmática en un número aproximado de 7-10 canales por célula; dentro de las características más sobresalientes de la actividad de estos canales son las propiedades de activación por voltajes positivos y no por voltajes negativos, su alta selectividad al ion potasio comparada con el sodio, conductancia de 20 picosiemens, etc. Gustin plantea que la función de estos canales probablemente sea el regular la homeostasis del potencial de membrana celular. Van de Mortel,¹⁰⁴ trabajando con levaduras con glucosa o etanol como fuente de energía y pH alto, observaron flujo de potasio e hiperpolarización transitorios, sugiriendo como hipótesis al fenómeno, la apertura de canales de K⁺ de la membrana plasmática. El mismo grupo de Kung⁴⁰ reportó la existencia de otro canal iónico diferente al anterior, el cual se regula por energía mecánica (tensión de la membrana). La probabilidad de apertura de un canal mecanosensible regulado por tensión podría ser una función de la presión aplicada y del tamaño celular. Para canales regulados por presión osmótica, la probabilidad de apertura es independiente del tamaño celular. Estos canales tienen una selectividad muy pobre para los cationes alcalinos, indicando una función probable de osmoregulación y del potencial de la membrana, aprovechando el K⁺ acumulado como fuente de energía. Bertl,⁸ mediante análisis de "patch-clamp" caracterizó un canal rectificador entrante de potasio (codificado por el gen *KAT1*, que también identificaron otros autores como *TOK1*).⁵⁰

Aparentemente, la membrana plasmática de las levaduras posee diferentes clases de canales selectivos para K⁺

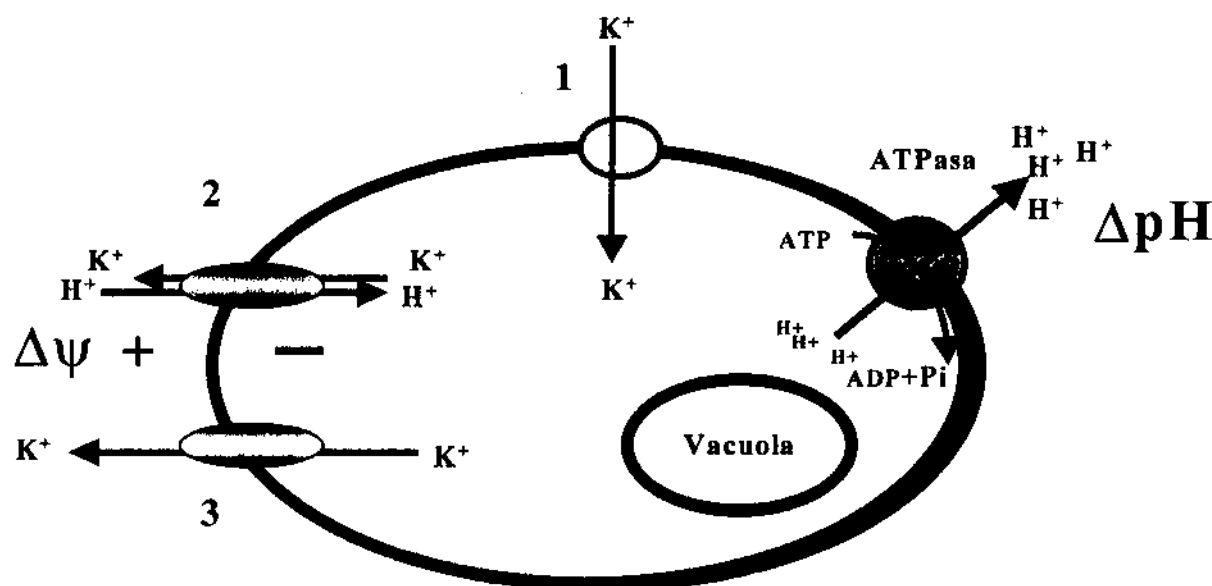


Fig. 1 Sistemas de transporte de potasio en la levadura. 1: uniportador; 2: antiportador; H^+ - K^+ ; 3: canales iónicos.

que difieren en las propiedades de apertura; van de Mortel¹⁰⁵ propuso otro canal selectivo de potasio el cual se abre transitoriamente al comienzo del metabolismo celular a valores de pH por arriba de 5.5 y que puede ser bloqueado por concentraciones micromolares de cationes polivalentes externos por su posible interacción con un sitio externo del canal; pero que difiere de los canales descritos por Gustin en su insensibilidad a TEA y 3,4-diaminopiridina, entre otras cosas.

Sin embargo, es difícil definir en ese momento la naturaleza de los resultados presentados por van de Mortel,¹⁰⁴ ya que bajo ciertas condiciones la salida de potasio puede estimularse por el terbio (Tb^{3+}) y el gadolinio (Gd^{3+}),⁶⁹ el cual se había descrito como un inhibidor de canales iónicos.⁴⁰ Peña y col. mostraron que, bajo sus condiciones experimentales, los resultados correlacionan más con un sistema intercambiador K^+ - H^+ .^{17,73} Para este intercambiador existe un gen, el *KHA1*,⁷⁴ cuya presencia es importante para la regulación del pH interno y el contenido de K^+ de la levadura. La fig. 1 muestra en forma resumida los diferentes sistemas de transporte del potasio descritos en la levadura, es decir, el simportador de potasio, cuya fuerza impulsora es la diferencia de potencial eléctrico ($\Delta\Psi$); el intercambiador H^+/K^+ , utiliza la diferencia de pH (ΔpH) para mover potasio hacia el medio externo; y los canales catiónicos, que responden al $\Delta\Psi$ o al potencial osmótico.

El potencial de membrana y el transporte del K^+

Las investigaciones que se realizaron fundamentalmente en los cincuenta por Conway, estimularon el desarrollo de la hipótesis quimiosmótica. Durante muchos años se buscó un intermediario químico que acoplara la oxidación

metabólica con la síntesis de ATP. Posteriormente, Peter Mitchell en 1961,⁵⁵ inspirado en los trabajos de Conway postuló la hipótesis quimiosmótica con el propósito de explicar los mecanismos de conservación de energía y el transporte de iones en los sistemas vivos.

Fue así que Mitchell^{55,56} sugirió que el único "intermediario" en la fosforilación oxidativa era un gradiente de protones creado a través de la membrana. La idea central de su hipótesis establece que la cadena transportadora de electrones de las mitocondrias o bacterias está acoplada a la síntesis de ATP mediante un potencial electroquímico de protones ($\Delta\mu_{H^+}$), el cual se crea a través de las membranas transductoras de energía y es necesario también para mover los iones al interior de las mitocondrias (o las bacterias), en contra del gradiente de concentración química mediante sistemas de transporte específicos. De acuerdo con esta teoría, los sistemas de transporte de electrones pueden ser sistemas de transposición primaria o bombas, que proporcionan la energía con que opera una ATP sintetasa para generar el ATP de la célula.

Los experimentos, en la levadura y la teoría de Mitchell, condujeron al planteamiento de la existencia de una bomba de protones en la membrana plasmática. Esto es claro en los trabajos de Peña y col.,^{62,65,66} sobre el efecto del pH y del K^+ sobre la glucólisis y la respiración en las levaduras. Ahí se plantea la posible existencia de una ATPasa que funciona como una bomba de protones, que consume una fracción apreciable del ATP celular y se inhibe por altas concentraciones de H^+ en el medio, pero además que puede estimularse por aumento en el pH o por la presencia de potasio.

Debe señalarse que la forma de aclarar el problema no fue sencilla. A partir de los resultados de inhibición del

transporte de K^+ obtenidos con desacoplantes, varios autores habían elaborado hipótesis acerca de los mecanismos involucrados para dicho efecto. No obstante la ya clara vigencia de la hipótesis de Mitchell en esa época, Riemersma⁸⁰ propuso que en la transducción de energía, a partir de las fuentes celulares hacia los sistemas de transporte en la membrana, estaba involucrada la hidrólisis de un intermediario hipotético de alta energía. Borst-Pauwels,¹² señalaba a partir de datos cinéticos, que la presencia de bajas concentraciones de DNP inhibía el transporte de Rb^+ por un efecto directo del desacoplante sobre el acarreador. Misra y Höfer⁵⁷ reportaron que la levadura *Rhodotorula gracilis*, aeróbica obligada, bombea H^+ por un proceso que requiere K^+ y es sensible a desacoplantes y a DCCD. Como dato adicional se sabía, por los trabajos en electrofisiología de Slayman⁹⁹ con *N. crassa*, empleando microelectrodos, que el potencial de membrana era extremadamente sensible al DNP traduciéndose en una despolarización en cuestión de segundos, indicando que una bomba de iones electrogénica estaba directamente acoplada al metabolismo y funcionaba para separar cargas a través de la membrana plasmática.

Peña⁶², realizó una serie de experimentos con desacoplantes (igual que De la Peña²⁹), y observó que el efecto de los mismos dependía de la dirección de los gradientes combinados de H^+ y K^+ o del potencial electroquímico de la célula y de acuerdo con la capacidad reportada para conducir protones a través de la membrana, demostró la existencia de una bomba de protones (ATPasa), responsable de crear el potencial electroquímico que involucra el transporte de potasio de una forma acoplada pero independiente, acorde a lo descrito por la hipótesis quimiosmótica. La fig. 2 muestra algunos modelos para el bombeo de protones y transporte de potasio.

El potasio de esta forma acumulado utiliza y por tanto disminuye el potencial de membrana formado por el bombeo de protones, permitiendo crear un gran ΔpH y mantener un $\Delta \Psi$ de -45 a -80 mV en *S. Cerevisiae*.³⁰ Höfer y col.⁴⁵ llegan a conclusiones similares en *Rhodotorula gracilis*, pero su interpretación para el acoplamiento del flujo de potasio difiere, mencionando un sistema electroneutro dependiente de energía.⁴²

La identificación de la ATPasa de la membrana plasmática, como componente responsable del bombeo de protones capaz de generar un gradiente electroquímico, viene de estudios con mutantes de levadura deficientes en la respiración e inhibidores de ATPasa de membrana plasmática. Con estas mutantes de *S. cerevisiae*, Serrano⁹⁴ observó que el dietilestilbestrol y la DCCD inhibían la actividad de la ATPasa y el bombeo de protones de una manera específica, sin afectar los niveles de ATP celular ni la permeabilidad de los protones. Estos resultados sugerían que la actividad de la ATPasa de membrana plasmática correspondía con la bomba de protones en la levadura.

Posteriormente, se obtuvo una evidencia directa de la actividad de bombeo de la ATPasa de membrana plasmática y electrogenicidad del proceso, al purificar la enzima y

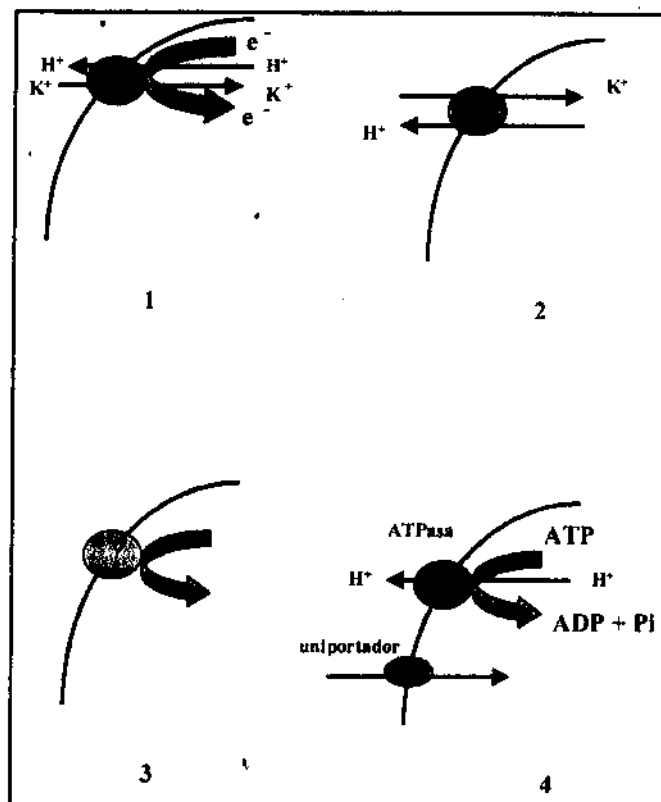


Fig. 2 Modelos alternativos para el bombeo de protones y transporte de potasio. 1, Bomba Redox; 2, acarreador electroneutro; 3, existencia de un intermediario; 4, bomba electrogénica acoplada al transporte de K^+ mediante sistemas diferentes.

reconstituirla en liposomas.^{54,106} En este sistema, el ATP se hidrolizaba del lado externo de la membrana y la entrada de H^+ generaba un potencial de membrana, positivo en el interior durante la hidrólisis. La naturaleza electrogénica del bombeo de protones, se demostró por la transposición de H^+ que sólo tiene lugar en presencia de un catión (K^+ -valinomicina) para compensar las cargas. Además, se observó que el gradiente electroquímico de protones generado a través de la membrana del liposoma controlaba la velocidad de hidrólisis de ATP, y la estequiometría del bombeo (H^+/ATP) de la ATPasa era modulada por el metabolismo en *N. crassa*.¹⁰⁸

Como se puede inferir, la bomba de protones de la membrana plasmática dirige, funciones fisiológicas que son vitales para la levadura. Por esto se espera que su actividad sea fuertemente regulada por diversos factores, como lo reportan algunos grupos de investigación. Por ejemplo, De la Peña y col.³⁰ habían observado hiperpolarización de las células de levadura, cuando se preincubaban con glucosa, o inducción de un estado activado de la ATPasa de membrana plasmática por este sustrato.⁹⁵ Eraso y Gance-



do,³⁵ y posteriormente Carmelo,¹⁸ encontraron que se produce activación de ATPasa por la disminución del pH extracelular, así como por el ayuno de nitrógeno⁷ además del etanol⁸⁵ (efecto no observado *in vitro* por Cartwright¹⁹).

Hay varios mecanismos, para la formación de los potenciales electroquímicos a través de las membranas biológicas. Desde luego que en la levadura, el más importante es el generado por el bombeo de protones por la ATPasa de la membrana plasmática, y se pueden cuantificar, según el mecanismo, por las teorías de Nerst o la de Donnan que permiten calcular la magnitud del potencial o describir la relación de concentración de los iones a través de dos fases respectivamente.

El potencial de Donnan

Existe un caso en que, los potenciales de difusión se producen cuando la membrana es impermeable a uno de los iones de una sal. Esta situación influye de un modo particular en las estructuras celulares transductoras de energía, debido a las cargas negativas "fijas" de los fosfolípidos y proteínas, u otras moléculas que las constituyen. Como resultado, cuando se resuspenden estas estructuras en un medio de baja fuerza iónica, los cationes móviles salen del orgánulo, hasta que el potencial inducido compensa el gradiente de concentración de cationes.

Donnan y Gibbs mostraron que en presencia de un ion que no difunde, los iones que sí difunden, se distribuyen de manera que, en el equilibrio, sus relaciones de concentración son iguales.

$$[K^+_{ext}] [K^+_{int}] = [HCO_3^-_{int}] [HCO_3^-_{ext}]$$

La medida del potencial transmembranal

Con el desarrollo del conocimiento sobre el potencial de membrana, se han desarrollado numerosas técnicas para medir el potencial transmembranal de las células. En las células grandes, se utilizan microelectrodos; por ejemplo, en *N. crassa* se encontró un gran potencial en células maduras y pH alto de -260 mV.⁹⁹ En *Endomyces magnusii*, que tiene aproximadamente 100 veces el volumen de *S. cerevisiae* se reportó un potencial estable a pH 7.5 de -35 mV.^{5, 103}

Sin embargo, las células de levadura, sus organelos y vesículas son muy pequeños para ser estudiados por microelectrodos; en *S. cerevisiae*, el potencial de membrana medido por medio de microelectrodos no es estable y decae con una vida media de 0.2-3 seg; además, no se observaron diferencias significativas en el potencial de membrana cuando el sistema estaba en presencia de DNP 1 mM, o diferentes estados metabólicos.¹³

En 1978, utilizando cationes como el tetrafenilfosfonio (TTP⁺) y el trimetilfenilfosfonio, se midieron cambios en la diferencia de potencial eléctrico a través de estructuras pequeñas rodeadas de membranas, ya que estos agen-

tes, por su naturaleza lipofílica, son capaces de atravesar la membrana celular y su distribución depende del potencial transmembranal.⁴¹ Sin embargo, parece que la relación de distribución del TTP⁺ (sin haber polarización de la membrana ni disminución de los niveles de ATP) no tiene relación con el voltaje de la membrana, ni en la magnitud, ni en la sensibilidad a los cambios del pH. Estas limitaciones muestran que la acumulación de TPP⁺ no se puede utilizar como método cuantitativo para medir el potencial de la membrana.^{5,6}

También se han utilizado colorantes fluorescentes como prueba cualitativa de los cambios del potencial de membrana. Waggoner,¹⁰⁷ revisó en 1979 las tres clases principales de colorantes sensibles a potencial: merocianinas, cianinas y oxonoles. Estas moléculas son permeantes a la membrana y el mecanismo involucra la redistribución o acumulación de la molécula entre el medio y el interior de la célula, dependiente del potencial, lo que produce cambios en la fluorescencia y transmisión de la luz.

En 1984 Peña y col.,⁶⁸ reportaron el comportamiento anormal de los cambios en la fluorescencia de la ditiocarbocianina (cianina) en un intento de utilizarla como un indicador de los cambios en el potencial de membrana de levaduras, concluyendo que dicho compuesto es un buen indicador cualitativo del potencial de membrana mitocondrial y plasmática (cuando se anula la capacidad de la mitocondria para concentrar el colorante por medio de un agente desacoplante). Además, es importante mencionar que sobre una base cualitativa, la cianina se puede usar para seguir cambios rápidos en el potencial de membrana, ya que los cambios de fluorescencia son rápidos.

El potencial de superficie de la membrana

Por otro lado, la influencia de cargas fijas negativas en las membranas transductoras de energía, produce la formación de un potencial en la superficie, que causa que la concentración de iones en la vecindad inmediata de la membrana sea mayor que en el seno de la fase acuosa.⁴⁸ En membranas de fosfolípidos el grupo de Ohki^{2,58,59,60} y MacDonald,⁵³ fueron los primeros en mostrar la contribución del potencial de superficie al potencial transmembranal.

En las levaduras, los fosfolípidos de la membrana, como el fosfatidilinositol y la fosfatidilserina determinan en gran medida la magnitud de las cargas fijas o densidad de carga superficial negativa.²⁰ La composición de fosfolípidos aniónicos en la membrana celular es un factor que controla la densidad de carga superficial, y el potencial de superficie a su vez, se comporta como un factor que puede modular la síntesis de estos fosfolípidos aniónicos, regulando su composición y transposición (interna-externa).²¹

Parece ser que la presencia de estas cargas negativas de grupos de fosfolípidos, en la vecindad de los sitios de enlace involucrados en el transporte iónico en la membrana o pared celular, ejercen en cierta medida un efecto sobre la cinética del transporte, al acumular cationes y excluir a los

aniones en la membrana.^{13,20}

El papel de los aniones de ácidos débiles en la acumulación del K^+

Ryan,^{89,90} por otro lado trabajando con ácidos orgánicos que difunden a través de la membrana, propusieron que el pH intracelular era un factor importante en la regulación del transporte de potasio. Este asunto es importante, dada la gran cantidad de ácido carbónico y bicarbonato que la levadura, en especial *S. cerevisiae*, acumula en su interior.

Dado que la entrada de K^+ a la célula implica que haya salida de protones y por consiguiente que el pH interno aumente, pareciera que este hecho impediría mayor entrada de potasio; considerando que el intercambio H^+-K^+ es eficiente a un pH intracelular bajo, la presencia de estos ácidos orgánicos que acidifican el citosol permitiría la entrada del catión en ausencia, inclusive, de una fuente de energía asimilable.⁹⁰

Hasta este momento, a pesar de que el efecto del transporte del catión monovalente parecía deberse a la influencia de los ácidos orgánicos que provocan la disminución del pH en el citosol, Peña,⁶² en un estudio sobre el transporte de K^+ en levaduras, burbujó nitrógeno al medio con el cual podía lavar el CO_2 que se produce por fermentación y observó una menor acumulación interna de potasio. Empero, si se permitía a la célula acumular primero el CO_2 y evitar parcialmente la alcalinidad intracelular, por el equilibrio químico que se establece entre esta molécula y el par H_2CO_3/HCO_3^- al pH interno existente, el burbujeo de N_2 en estas condiciones, no sólo bloqueaba la entrada de potasio, sino que además producía una salida de K^+ que podía revertirse por el burbujeo de CO_2 al medio de incubación. De estos resultados y trabajando con diferentes ácidos orgánicos que difunden, concluyó que además de la acidificación del medio, los aniones y la magnitud de su acumulación eran importantes en el proceso de captación del potasio ya que se requerían para retener al mismo en el interior.^{62,87}

Por otro lado, aún cuando los sistemas de transporte de potasio en la levadura se activan por la presencia de azúcares fermentables (y no por etanol)⁷⁸ también se ha observado que los productos metabólicos de la glucólisis o la respiración, en especial los aniones bicarbonato, son capaces de activar los sistemas de captación de K^+ .⁵² Estos resultados llevaron a plantear la hipótesis de que la acumulación de K^+ se pueda favorecer por la generación de un gradiente de concentración de cargas negativas (aniones; principalmente bicarbonato) que no difunden, de acuerdo con un equilibrio Donnan (fig. 3), y cuya relación de distribución entre ambos lados de la membrana es función del pH externo y el pH interno alcanzados durante el metabolismo. Se propone así que por la acumulación de HCO_3^- , que depende de los valores relativos del pH_i y del pH_e , se puede utilizar indirectamente el gradiente de pH sin necesidad de un importador H^+/K^+ como el descrito para *Neurospora*.⁸³

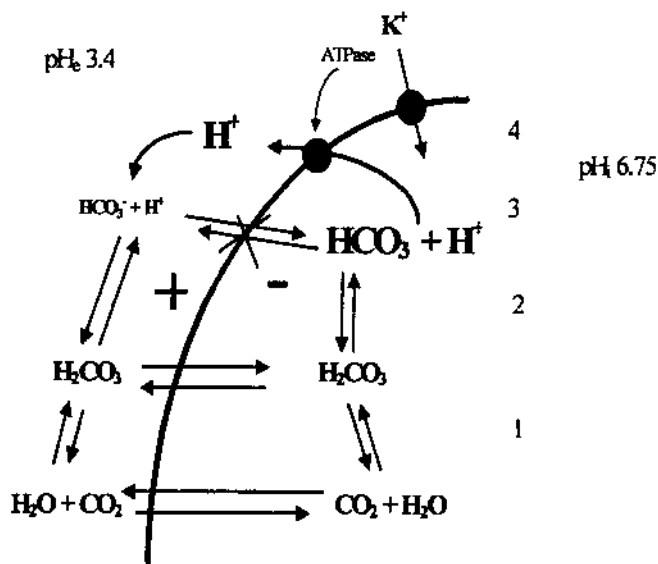


Fig. 3. Esquema representativo del efecto Donnan. 1, reacción de hidratación espontánea del CO_2 , que produce H_2CO_3 , el cual se disocia en bicarbonato y un protón; 2, La ATPasa de la membrana plasmática expulsa el protón; 3, ello baja el pH externo y aumenta el pH interno. El ácido carbónico es capaz de difundir libremente a través de la membrana plasmática, mientras el bicarbonato no. A un alto valor de pH interno, 6.75 en la fig., la disociación del ácido carbónico se desplaza para producir bicarbonato. A un valor bajo de pH externo, 3.4 en la fig., la especie predominante es el ácido carbónico. Ya que el bicarbonato no puede difundir, éste permanece dentro, generando un potencial eléctrico adicional, que puede dirigir una acumulación mayor de potasio a través de su acarreador.

Activación de los sistemas de la entrada de potasio por mecanismos secundarios

Los procesos por los cuales las levaduras son capaces de transportar iones a su interior son impulsados por la diferencia de potencial de membrana y del ΔpH que genera la ATPasa. Sin embargo, existen ciertas características cinéticas particulares del transporte de potasio, que han sido objeto de otros estudios.

Los resultados en las investigaciones del transporte de Rb^+ en *S. cerevisiae*, tratadas con azida de sodio con la cual fue posible preparar cultivos con diferentes contenidos de K^+ interno, mostraron que la entrada del catión aumentaba con la disminución del contenido de K^+ . En cuanto a la salida de Rb^+ , existe un límite constante del contenido de potasio interno donde la célula no pierde más potasio.⁷⁶ Posteriormente, Ramos y col.,⁷⁷ plantean que el mecanismo que puede explicar esta respuesta, a células con bajo



contenido de K^+ , es el efecto de la disminución de pH_i (interno) o la activación directa de la ATPasa de la membrana plasmática.

El mismo grupo en 1992⁷⁸ sugiere, en función de resultados cinéticos, que la captación de K^+ también se regula por fermentación; es decir, el análisis cinético del transporte de Rb^+ realizado con mutantes, que perdieron el sistema del transporte de glucosa de alta afinidad o que tiene defectuoso el gen de la ATPasa, cuyo producto es una enzima permanentemente activada, mostró que la presencia de glucosa u otros azúcares fermentables era capaz de inducir un aumento en la V_{max} sin afectar la K_m , fenómeno que no se produce ante la respiración con etanol, y que se observa baja activación con bajas concentraciones de glucosa en el medio. Por otro lado, la salida de potasio no se afecta por la presencia del azúcar.⁷⁸

Los sistemas de entrada de potasio activados por la fermentación dependen de la fosforilación del azúcar, independientemente del resto de la vía metabólica de ésta, e independiente de la ruta del cAMP y la disminución del pH_i ; así proponen Alijo y Ramos,¹ trabajando con mutantes de cinasas de azúcares y con análogos de glucosa no asimilables (2-desoxiglucosa), señalando que la fosforilación del azúcar es suficiente para disparar la ruta de activación, haciendo notar que ninguno de los dos componentes identificados del sistema de transporte de potasio, Trk1 y Trk2, son los receptores activados por este mecanismo.

Los cambios del pH intracelular y el transporte en *S. cerevisiae*

Durante la actividad metabólica celular se genera una gran cantidad de compuestos, los cuales tenderían a producir una acidificación interna; por esta razón, la medida del pH interno ha sido un tópico analítico importante en el área, ya que el pH determina muchas características importantes de la estructura y actividad de varias moléculas biológicas y procesos (incluyendo los de transporte) y, por lo tanto, del comportamiento general de las células. Si además, una buena parte de los fenómenos de transporte de la levadura depende de la actividad de una ATPasa que bombea protones al exterior, es necesario tener información sobre los cambios del pH intracelular. Esta ATPasa, además, aumenta su actividad cuando la célula transporta K^+ .

En la mayoría de las células, los primeros métodos para estimar el valor de pH_i se realizaron directamente en lisados u homogeneizados de células preparados, ya fuera por ebullición o congelamiento-descongelamiento. Esta homogeneización celular, al provocar la ruptura de los organelos intracelulares, hace difícil calcular el pH del citosol.⁸⁴ En las células de levadura, el grupo de Conway²⁶ utilizó la distribución de ácidos orgánicos débiles, como propiónico y carbónico para medir el pH_i , con fundamento en que sólo la forma protonada es permeante a la membrana. Entonces el pH_i puede calcularse de su distribución en el estado estacionario si el pH_e y el valor del pK_a interno y externo se conocen (estas constantes se relacionan a través de la ecuación

de Henderson-Hasselbalch).

Deamer³¹ utilizó moléculas fluorescentes ionizables que son permeantes a la membrana y pueden distribuirse entre el interior de la célula y organelos y el medio externo en función del pH , con el fin de determinar el gradiente de pH a través de la membrana de liposomas. Slavík⁹⁷ introdujo la técnica a las levaduras utilizando un éster fluorescente, que al entrar en contacto con esterasas, se transforma produciendo una molécula impermeante a la membrana, que se retiene en el interior de la célula. De este modo estimó el gradiente de pH a través de la membrana de la levadura.⁹⁸

Sin embargo, Slayman¹⁰⁰ menciona que las esterasas se encuentran acumuladas preferentemente en las vacuolas u otros compartimentos internos donde llevan a cabo su acción, señalando una desventaja para el uso de este colorante, por su distribución preferente en la vacuola.

Otro método diferente descrito en la literatura aplicado a células de levadura intactas, es la determinación del pH interno por el espectro de resonancia magnética nuclear del ^{31}P , sobre la base del cambio químico que sufre el ortofosfato intracelular en función del pH_i .^{33,38,93}

Kano y Fendler⁴⁹ utilizaron la piranina como un indicador fluorescente del pH , para medir el pH interno en liposomas. Pero la desventaja que presentaba para utilizarla en células completas era su naturaleza hidrofílica y por tanto, su impermeabilidad a ella. Para superar esta limitación, Peña y col.⁷⁰ y Höfer y col.⁴⁶ introdujeron la molécula a células de levadura por electroporación, teniendo la ventaja de que además de localizarse en el citoplasma, los cambios de fluorescencia registrados corresponden al movimiento de protones de la levadura bajo diferentes condiciones de incubación. Los datos obtenidos del pH interno de la célula concuerdan con los valores reportados por otros métodos,^{26,43,67,72,97} aunque un poco más altos, quizá porque sean más representativos de citosol, ya que la piranina se encuentra esencialmente en el citoplasma⁴⁶ sin reportar información de compartimentos celulares, como la vacuola, que es más ácida.

Ya sea por un método o por otro, los diferentes grupos de investigación han tratado de determinar la respuesta del pH_i bajo diferentes condiciones de incubación. Peña y col.,^{67,70} reportaron que el pH externo influye de una manera directa en el pH intracelular, en contraste con lo que reportaron den Hollander y col.³³, Slavík y Kotyk⁹⁸ y Cimprich y col.²³ confirmaron también la dependencia del pH intracelular del pH del medio, al medir con indicadores fluorescentes la distribución del pH citoplásmico.

Por otro lado, el pH celular también depende del estado metabólico de la célula y de las diferentes condiciones de cultivo.⁴⁷ En 1989 Ramos y col.⁷⁹ demostró que la adición de glucosa o fructosa inducía la acidificación intracelular en *S. cerevisiae*, sugiriendo que los H^+ provienen de la etapa de fosforilación, argumentando que el pK_a de la glucosa-6-P es de 1.4 mientras el pK_a de los grupos disociables del ATP es cercano a 7.0. Además este fenómeno no se presenta en mutantes deficientes de todas las azúcar-

cinastas, ni tampoco se correlaciona con el aumento del cAMP.³⁶

A pesar de los cambios en el pH interno con respecto a diferentes factores, existe una tendencia de la célula a mantener la concentración de H^+ interna, dentro del intervalo de operación óptima de varias enzimas citoplásmicas;⁸⁴ es claro que la constancia del pH intracelular representa un estado estacionario y no de equilibrio real. Por esta razón, algunos autores han tratado de atribuirle un papel predominante al bombeo de protones en el control del pH interno. Sanders y col.,⁹¹ en *N. crassa* observó que una carga ácida causa disminución en el pH_i , aumentando el bombeo de H^+ al exterior, congruente con su papel como sustrato de la bomba, acompañado de una hiperpolarización transitoria al inicio de la acidificación citoplásmica. Sin embargo, señala que la función de la bomba como controladora del pH_i no es muy clara, porque por un lado es predominante la participación de la ATPasa para mantener una gran diferencia de $\Delta\mu_{H^+}$, pero no necesariamente la regulación del pH_i estaría a cargo de la misma bomba. Este mismo grupo⁹² reconoce que la influencia que la bomba tiene sobre el pH citoplásmico es limitada, puntualizando la importancia de otros mecanismos, como el propio metabolismo, el cual puede liberar o consumir una buena cantidad de protones y es capaz de controlar el pH_i , aún cuando la bomba de protones sea inhibida. Blatt¹⁰ propuso que la respuesta primaria a estrés por ácido es el aumento en la actividad de la ATPasa de la membrana plasmática, pero que el transporte de K^+ constituye una válvula esencial que puede regular la salida de H^+ por medio de un simportador que describe en *Neurospora*. En las levaduras no se ha descrito este simportador.

La regulación del pH interno de la levadura

El principal mecanismo por el cual la levadura se deshace de los protones consiste en su transposición a través de la membrana por medio de la H^+ -ATPasa, con lo cual retiene una cantidad considerable de aniones de ácidos débiles producto de su metabolismo. Este asunto lleva a la discusión sobre lo que podría llamarse el papel regulador de la H^+ -ATPasa de la membrana plasmática sobre el pH interno de la célula. Considerando que es esta enzima la que se deshace de una gran parte de los protones derivados del metabolismo, podría decirse que sí regula el pH interno; sin embargo, parece tratarse más bien de una capacidad de la enzima simplemente para bombear más protones mientras más hay, pero no a un papel regulador propiamente dicho.

De hecho, el bombeo de protones por parte de la ATPasa da lugar no sólo a que el pH interno no se acidifique, sino que al contrario, en presencia de glucosa, que se esperaría produjera valores más bajos que en presencia de etanol, por la producción de CO_2 y el ácido carbónico derivado de su hidratación, en realidad sea más alto.⁵² De esta manera, el bombeo de protones por la H^+ -ATPasa de la

membrana plasmática, en especial a valores altos de pH externo o aún a pHs bajos en presencia de K^+ , da lugar en realidad a una alcalinización del citoplasma, pues el resultado neto es la acumulación de bicarbonato.^{65,66,62} Resulta entonces que la ATPasa es más bien la responsable de los cambios, que la reguladora del pH interno.

La regulación del pH interno al final requiere de un mecanismo que evite una exagerada alcalinización en presencia de glucosa, tanto a un pH del medio, como en presencia de K^+ . Al respecto, Ramírez y col.⁷⁴ han propuesto que es un intercambiador H^+/K^+ el que tiene entonces la función de expulsar al catión monovalente a cambio de protones y evitar la alcalinización exagerada del citoplasma.

REFERENCIAS

1. Alijo, R. and Ramos, J. 1993. Several routes of activation of the potassium uptake system of yeast. *Biochim. Biophys. Acta.* 1179:224-228.
2. Aono, O. and Ohki, S. 1972. Origin of resting potential of axon membrane. *J. Theor. Biol.* 37: 273-282.
3. 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.
4. Armstrong, W. M. and Rothstein, A. 1967. Discrimination between alkali metal cations by yeast. II. Cation interactions in transport. *J. Gen. Physiol.* 50:968-988.
5. Bakker, R., Dobbeltmann, J. and Borst-Pauwels, G. W. F. H. 1986. Membrane potential in the yeast *Endomyces magnusii* measured by microelectrodes and TPP⁺ distribution. *Biochim. Biophys. Acta.* 861:205-209.
6. Ballarin-Denti, A. Slayman, C. L. and Kuroda, H. 1994. Small lipid-soluble cations are not membrane voltage probes for *Neurospora* or *Saccharomyces*. *Biochim. Biophys. Acta.* 1190: 43-56.
7. Benito, B., F. Portillo, y R. Lagunas. 1992. In vivo activation of the yeast plasma membrane ATPase during nitrogen starvation. Identification of the regulatory domain that controls activation. *FEBS Lett.* 300:271-274.
8. Bertl, A., J. A. Anderson, C. L. Slayman, y R. F. Gaber. 1995. Use of *Saccharomyces cerevisiae* for patch-clamp analysis of heterologous membrane proteins: Characterization of KAT1, an inward-rectifying K^+ channel from *Arabidopsis thaliana*, and comparison with endogenous yeast channels and carriers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:2701-2705.
9. Blatt, M. R., A. Rodríguez-Navarro, y C. L. Slayman. 1987. Potassium-proton symport in *Neurospora*: Kinetic control by pH and membrane potential. *J. Membr. Biol.* 98:169-189.
10. Blatt, M. R., y C. L. Slayman. 1987. Role of "active" potassium transport in the regulation of cytoplasmic pH by nonanimal cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 84:2737-2741.



11. Borst-Pauwels, G. W. F. H., P. Schnetkamp, y P. Van Well, P. 1973. Activation of Rb⁺ and Na⁺ uptake into yeast by monovalent cations. *Biochim. Biophys. Acta* 291:274-279.
12. Borst-Pauwels, G. W. F. H., G. H. J. Wolters, J. J.G. Henricks. 1971. The interaction of 2,4-dinitrophenol with anaerobic Rb⁺ transport across the yeast cell membrane. *Biochim. Biophys. Acta* 225:269-276.
13. Borst-Pauwels, G. W. F. H. 1981. Ion transport in yeast. *Biochim. Biophys. Acta* 650:88-127.
14. Boxman, A. W., J. Dobbeltmann, y G. W. F. H. Borst-Pauwels. 1984. Possible energization of K⁺ accumulation into metabolizing yeast by the proton motive force. Binding correction to be applied in the calculation of the yeast membrane potential from tetraphenylphosphonium distribution. *Biochim. Biophys. Acta* 772:51-57.
15. Brunner, A., N. Carrasco, N., y A. Peña. 1982. Correlation between resistance to ethidium bromide and changes in monovalent cation uptake in yeast. *Arch. Biochem. Biophys.* 217:30-36.
16. Calahorra, M., G. A. Martínez, A. Hernández-Cruz, y A. Peña. 1998. Values of yeast cytoplasmic and vacuolar pH, the influence of monovalent cations. *Yeast* 14:501-515.
17. Camarasa, C., S. Prieto, R. Ros, J. Salmon, y P. Barre. 1996. Evidence for a selective and electroneutral K⁺/H⁺-exchange in *Saccharomyces cerevisiae* using plasma membrane vesicles. *Yeast* 12:1301-1313.
18. Carmelo, V., H. Santos, y I. Sá-Correia. 1997. Effect of extracellular acidification on the activity of plasma membrane ATPase and on the cytosolic and vacuolar pH of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim. Biophys. Acta* 1325:63-70.
19. Cartwright, C. P., F. J. Veazey, y A. H. Rose. 1987. Effect of ethanol on activity of the plasma membrane ATPase, and accumulation of glycine by *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Gen. Microbiol.* 133:857-865.
20. Cerbón, J. y V. Calderón. 1990. Proton-linked transport systems as sensors of change in the membrane surface potential. *Biochim. Biophys. Acta* 1028:261-267.
21. Cerbón, J. y V. Calderón, V. 1994. Surface potential regulation of phospholipid composition and in-out translocation in yeast. *Eur. J. Biochem.* 219:195-200.
22. Chapell, J. B. 1963. The effect of alkylguanidines on mitochondrial metabolism. *J. Biol. Chem.* 238:410-417.
23. Cimprich, P., J. Slavík, y A. Kotyk. 1995. Distribution of individual cytoplasmic pH values in a population of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol. Lett.* 130:245-252.
24. Conway, E. J. y T. G. Brady, T. G. Biological production of acid and alkali. 1950. I. Quantitative relations of succinic and carbonic acids to the potassium and hydrogen ion exchange in fermenting yeast. *Biochem. J.* 47:360-369.
25. Conway, E. J., T. G. Brady, y E. 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.
26. Conway, E. J. y M. Downey, M. 1950. pH values of the yeast cell. *Biochem. J.* 47:355-360.
27. Conway, E. J., y E. O'Malley, E. 1946. The nature of the cation exchanges during yeast fermentation, with formation of 0.02N-H ion. *Biochem. J.* 40:59-67.
28. Conway, E. J., y F. Duggan. 1958. A cation carrier in the yeast cell wall. *Biochem. J.* 69:265-274.
29. De la Peña, P., F. Barros, S. Gascón, P. Sánchez Lazo, P., y S. Ramos. 1981. Effect of yeast killer toxin on sensitive cells of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 256:10420-10425.
30. De la Peña, P., F. Barros, S. Gascón, S. Ramos, y P. Sánchez-Lazo. 1982. The electrochemical proton gradient of *Saccharomyces*. The role of potassium. *Eur. J. Biochem.* 123:447-453.
31. Deamer, D. W., R. C. Prince, y A. R. Crofts. 1972. The response of fluorescent amines to pH gradients across liposome membranes. *Biochim. Biophys. Acta* 274:323-335.
32. Derks, W. J. G. y G. F. W. H. Borst-Pauwels. 1980. Interaction of monovalent cations with Rb⁺ and Na⁺ uptake in yeast. *Biochim. Biophys. Acta* 596:381-392.
33. Den Hollander, J. A., K. Ugurbil, T. R. Brown, y R. G. Shulman. 1981. Phosphorous-31 nuclear magnetic resonance studies of the effect of oxygen upon glycolysis in yeast. *Biochemistry* 20:5871-5880.
34. Eddy, A. A., K. J. Indge, K. Backen, y J. A. Nowacki. 1970. Interactions between potassium ions and glycine transport in the yeast *Saccharomyces carlsbergensis*. *Biochem. J.* 120:845-852.
35. Eraso, P., y C. Gancedo. 1987. Activation of yeast plasma membrane ATPase by acid pH during growth. *FEBS Lett.* 224:187-192.
36. Eraso, P., M. J. Mazón, y J. M. Gancedo. 1987. Internal acidification and cAMP increase are not correlated in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur. J. Biochem.* 165:671-674.
37. Gaber, R. F., C. A. Styles, y G. R. Fink, G. R. 1988. *TRK1* encodes a plasma membrane protein required for high-affinity potassium transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 8: 2848-2859.
38. Gillies, R. J., K. Ugurbil, J. A. Den Hollander, y R. G. Shulman. 1981. ³¹P NMR studies of intracellular pH and phosphate metabolism during cell division cycle of *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 78:2125-2129.
39. Gustin, M. C., B. Martinac, Y. Saimi, M. R. Culbertson, y C. Kung. 1986. Ion channels in yeast. *Science* 233:1195-1197.
40. Gustin, M. C., X. Zhou, B. Martinac, y C. Kung.



1988. A mechanosensitive ion channel in the yeast plasma membrane. *Science* 242:762-765.
41. Hauer, R. y M. Höfer. 1978. Evidence for interactions between the energy-dependent transport of sugars and the membrane potential in the yeast *Rhodotorula gracilis* (*Rhodospirium thoruloides*). *J. Membrane Biol.* 43:335-349.
42. Hauer, R., G. Uhlemann, J. Neumann, y M. Höfer. 1981. Proton pumps of the plasmalemma of the yeast *Rhodotorula gracilis* their coupling to fluxes of potassium and other ions. *Biochim. Biophys. Acta.* 649:680-690.
43. Haworth, R. S., y L. Fliegel. 1993. Intracellular pH in *Schizosaccharomyces pombe* comparison with *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biochem.* 124:131-140.
44. Hille, B. 1971. The permeability of the sodium channel to organic cations in myelinated nerve. *J. Gen. Physiol.* 58:599-619.
45. Höfer, M., K. Nicolay, y G. Robillard. 1985. The electrochemical H^+ gradient in the yeast *Rhodotorula glutinis*. *J. Bioenerg. Biomemb.* 17:175-182.
46. Höfer, M., M. Calahorra, y A. Peña, A. 1996. Assessment of $\Delta\mu_{H^+}$ in *Schizosaccharomyces pombe*; intracellular inclusion of impermeable agents by electroporation. *Folia Microbiol.* 41:98-100.
47. Imai, T. y Ohno, T. 1995. Measurement of yeast intracellular pH by image processing y the change it undergoes during growth phase. *J. Biotechnol.* 38:165-172.
48. Junge, W. 1977. Membrane potentials in photosynthesis. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 28:503-536.
49. Kano, K., y J. H. Fendler. 1978. Pyranine as a sensitive probe for liposome interiors y surfaces. pH gradients across phospholipid vesicles. *Biochim. Biophys. Acta* 509:289-299.
50. Ketchum, K., W. J. Joiner, A. J. Sellers, L. K. Kaczmarek, y S. A. N. Goldstein. 1995. A new family of outwardly rectifying potassium channel proteins with two pore domains in tandem. *Nature* 376:690-695.
51. Ko, C. H., A. M. Buckley, y R. F. Gaber. 1990. *TRK2* is required for low affinity K^+ transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 125:305-312.
52. López, R., E. Enriquez, y A. Peña, A. 1999. Effects of weak acids on cation accumulation, ΔpH and $\Delta\psi$ in yeast. *Yeast* (en prensa)
53. MacDonald, R. C., y A. D. Bangham, A. D. 1972. Comparison of double layer potentials in lipid monolayers and lipid bilayer membranes. *J. Membr. Biol.* 7:29-34.
54. Malpartida, F. y R. Serrano, R. 1981. Reconstitution of the proton-translocating adenosine triphosphatase of yeast plasma membranes. *J. Biol. Chem.* 256:4175-4177.
55. Mitchell, P. 1961. Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transport by a chemiosmotic type of mechanism. *Nature* 191:144-148.
56. Mitchell, P. 1968. Chemiosmotic coupling and energy transduction. Bodmin, Cornwall: Glynn Research Ltd.
57. Misra, P. y M. Höfer, M. 1975. An energy-linked proton-extrusion across the cell membrane in *Rhodotorula gracilis*. *FEBS Lett.* 52:95-99.
58. Ohki, S. 1981. Membrane potential, Surface potential, and ionic permeabilities. *Physiol. Chem. & Physics.* 13:195-210.
59. Ohki, S. 1971. Electrical potential of an asymmetric membrane. *J. Colloid Interface Sci.* 37: 318-324.
60. Ohki, S. 1972 Membrane potential of phospholipid bilayers: Ion concentration and pH difference. *Biochim. Biophys. Acta* 282:55-71.
61. Peña, A. 1973. Studies with guanidines on the mechanism of K^+ transport in yeast. *FEBS Letters.* 34: 117-119.
62. Peña, A. 1975. Studies on the mechanism of K^+ transport in yeast. *Arch. Biochem. Biophys.* 167:397-407.
63. Peña, A., N. Carrasco, y M. A. Mora. 1979. Uptake and effects of several cationic dyes on yeast. *J. Membr. Biol.* 47:262-284.
64. Peña, A., G. Cinco, A. García, A. Gómez-Puyou, A. y M. Tuena. 1967. Effects of externally added sodium and potassium ions on the glycolytic sequence of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim. Biophys. Acta.* 148:673-682.
65. Peña, A., G. Cinco, A. Gómez-Puyou, y M. Tuena. 1969. Studies on the mechanism of stimulation of glycolysis and respiration by K^+ in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim. Biophys. Acta* 180:1-8.
66. Peña, A., G. Cinco, A. Gómez-Puyou, y M. Tuena. 1972. Effects of the pH of the incubation medium on glycolysis and respiration in *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch. Biochem. Biophys.* 153:413-425.
67. Peña, A. y G. Ramírez. 1975. Interaction of ethidium bromide with the transport system for monovalent cations in yeast. *J. Membr. Biol.* 22:369-384, 1975.
68. Peña, A., S. Uribe, J. P. Pardo, y M. Borbolla. 1984. The use of cyanine dye in measuring membrane potential in yeast. *Arch. Biochem. Biophys.* 231:217-225.
69. Peña, A. y J. Ramírez. 1991. An energy-dependent efflux system for potassium ions in yeast. *Biochim. Biophys. Acta* 1068:237-244.
70. Peña, A., J. Ramírez, G. Rosas, y M. Calahorra. 1995. Proton pumping and the internal pH of yeast cells, measured with pyranine introduced by electroporation. *J. Bacteriol.* 177:1017-1022.
71. Pressman, B. C. 1963. The effect of guanidine and alkylguanidines on the energy transfer reactions of mitochondria. *J. Biol. Chem.* 238:401-409.
72. Preston, R. A., R. F. Murphy, y E. W. Jones. 1989. Assay of vacuolar pH in yeast and identification of acidification-defective mutants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:7027-7031.
73. Ramírez, J., A. Peña, A. y M. Montero-Lomeli. 1996. H^+/K^+ exchange in reconstituted yeast plasma mem-



- brane vesicles. *Biochim. Biophys. Acta* 1285:175-182.
74. Ramírez, J., O. Ramírez, C. Saldaña, R. Coria, A. Peña. 1998. A *Saccharomyces cerevisiae* mutant lacking a K⁺/H⁺ exchanger. *J. Bacteriol.* 180:5860-5865.
 75. Ramos, J., P. Contreras, y A. Rodríguez-Navarro. 1985. A potassium transport mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch. Microbiol.* 143:88-93.
 76. Ramos, J. y A. Rodríguez-Navarro, A. 1986. Regulation and interconversion of the potassium transport system of *Saccharomyces cerevisiae* as revealed by rubidium transport. *Eur. J. Biochem.* 154:307-311.
 77. Ramos, J., R. Haro, y A. Rodríguez-Navarro. 1990. Regulation of potassium fluxes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim. Biophys. Acta.* 1029:211-217.
 78. Ramos, J., R. Haro, R. Alijo, R. y A. Rodríguez-Navarro. 1992. Activation of the potassium uptake system during fermentation in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* 174:2025-2027.
 79. Ramos, S., M. Balbín, M. Raposo, E. Valle, y L. A. Pardo. 1989. The mechanism of intracellular acidification induced by glucose in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Gen. Microbiol.* 135: 2413-2422.
 80. Riemersma, J. C. 1968. Effect of sodium azide and 2,4-dinitrophenol on phosphorylation reactions and ion fluxes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim. Biophys. Acta* 153:80-87.
 81. Rodríguez-Navarro, A., y J. Ramos, J. 1984. Dual system for potassium transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* 159:940-945.
 82. Rodríguez-Navarro, A., y J. Ramos, J. 1986. Two systems mediate rubidium uptake in *Neurospora crassa*: one exhibits the dual-uptake isotherm. *Biochim. Biophys. Acta.* 857:229-237.
 83. Rodríguez-Navarro, A., M. R. Blatt, y C. L. Slayman. 1986. A potassium-proton symport in *Neurospora crassa*. *J. Gen. Physiol.* 87:649-674.
 84. Roos, A. y W. F. Boron. 1981. Intracellular pH. *Physiol. Rev.* 61:296-434.
 85. Rosa, M. F. y I. Sá-Correia. 1991. In vivo activation by ethanol of plasma membrane ATPase of *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Environ. Microbiol.* 57:830-835.
 86. Rothstein, A. y Demis, C. 1953. The relationship of the cell surface to metabolism. The stimulation of fermentation by extracellular potassium. *Arch. Biochem. Biophys.* 44:18-29.
 87. Rothstein, A. y Bruce, M. 1958. The efflux of potassium from yeast cells into a potassium free medium. *J. Cell. Comp. Physiol.* 51:439-455.
 88. Rothstein, A. 1974. Relationship of cation influxes and effluxes in yeast. *J. Gen. Physiol.* 64:608-621.
 89. Ryan, H., J. P. Ryan, y W. H. O'Connor. 1971. The effect of diffusible acids on potassium ion uptake by yeast. *Biochem. J.* 125:1081-1085.
 90. Ryan, J. P. y H. Ryan. 1972. The role of intracellular pH in the regulation of cation exchanges in yeast. *Biochem. J.* 128:139-146.
 91. Sanders, D., U. P. Hansen, y C. L. Slayman. 1981. Role of the plasma membrane proton pump in pH regulation in non-animal cell. *Proc. Natl. Sci. USA* 78:5903-5907.
 92. Sanders, D. y C. L. Slayman. 1982. Control of intracellular pH. Predominant role of oxidative metabolism, not proton transport, in the eukaryotic microorganism *Neurospora*. *J. Gen. Physiol.* 80:377-402.
 93. Salhany, J. M., T. Yamane, R. G. Shulman, y S. Ogawa. 1975. High resolution ³¹P nuclear magnetic resonance studies of intact yeast cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 72:4966-4970.
 94. Serrano, R. 1980. Effect of ATPase inhibitors on the proton pump of respiratory-deficient yeast. *Eur. J. Biochem.* 105:419-424.
 95. Serrano, R. 1983. In vivo glucose activation of the yeast plasma membrane ATPase. *FEBS Lett.* 156:11-14.
 96. Serrano, R., M. C. Kielland-Brandt, y G. R. Fink, G. R. 1986. Yeast plasma membrane ATPase is essential for growth and has homology with (Na⁺ + K⁺), K⁺- and Ca²⁺-ATPases. *Nature* 319:689-693.
 97. Slavik, J. 1982. Intracellular pH of yeast cells measured with fluorescent probes. *FEBS Lett.* 140: 22-26.
 98. Slavik, J. y A. Kotyk, A. 1984. Intracellular pH distribution and transmembrane pH profile of yeast cells. *Biochim. Biophys. Acta.* 766:679-684.
 99. Slayman, C. L. 1965. Electrical properties of *Neurospora crassa* respiration and the intracellular potential. *J. Gen. Physiol.* 49:93-116.
 100. Slayman, C. L., V. V. Moussatos, y W. W. Webb. 1994. Endosomal localization of fluorescent indicators: Vacuolar sequestration of AM dyes in *Neurospora* and in cultured mammalian fibroblasts. *Biophys. J.* 66: A275.
 101. Slayman, C. W., W. S. Long, y C. H. Lu. 1973. The relationship between ATP and electrogenic pump in the plasma membrane of *Neurospora crassa*. *J. Membr. Biol.* 14:305-338.
 102. Slayman, W. C. y C. L. Slayman, C. L. 1970. Potassium transport in *Neurospora crassa*: Evidence for a multisite carrier at high pH. *J. Gen. Physiol.* 55:758-786.
 103. Vacata, V., A. Kotyk, y K. Sigler. 1981. Membrane potential in yeast cell measured by direct and indirect methods. *Biochim. Biophys. Acta.* 643:265-268.
 104. Van de Mortel, J. B. J., D. Mulders, H. Korthout, y A. P. R. Theuvenet. 1988. Transient hyperpolarization of yeast by glucose and ethanol. *Biochim. Biophys. Acta.* 936:421-428.
 105. Van de Mortel, J. B. J., A. P. R. Theuvenet, y G. W. F. H. Borst-Pauwels, G. W. F. H. 1990. A putative K⁺-selective channel in the plasma membrane of yeast that is blocked by micromolar concentrations of external divalent cation and is insensitive to tetraethylammonium. *Biochim. Biophys. Acta.* 1026:220-224.



106. Villalobo, A., M. Boutry, y A. Goffeau. 1981. Electrogenic proton translocation coupled to ATP hydrolysis by the plasma membrane Mg^{2+} -dependent ATPase of yeast in reconstituted proteoliposomes. *J. Biol. Chem.* 256: 12081-12087.
107. Waggoner, A. S. 1979. Dye indicators of membrane potential. *Ann. Rev. Biophys. Bioeng.* 8:47-68.
108. Warncke, J. y C. L. Slayman. 1980. Metabolic modulation of stoichiometry in a proton pump. *Biochim. Biophys. Acta.* 591:224-233.