

## La Regulación de los Niveles de Iones en la Levadura las Proteínas de la Membrana Plasmática Involucradas

CARLOS SALDAÑA\* Y ANTONIO PEÑA

Departamento de Genética Molecular, Instituto de Fisiología Celular. Universidad Autónoma de México, Apartado Postal 70-242. 04510. México, D. F.

\*Autor para la correspondencia: Tel. 56-22-56-52. Fax. 56-22-56-30. E-mail [csaldana@ifisiol.unam.mx](mailto:csaldana@ifisiol.unam.mx)

**ABSTRACT.** Potassium transport across a membrane mechanism in yeast cells have not been completely understood. Although many membrane proteins have been characterized, their specific role in potassium transfer is still unknown. Yeast cells typically maintain high intracellular concentrations through several potassium transport systems, making this system of study an optimal eukaryotic cell to explain potassium transport across membrane. Three types of protein related with potassium transport across membrane have been described: (1) the energy necessary for potassium accumulation (150 mM) is released by electrical gradients maintained across the membrane by  $H^+$ -ATPase; (2) the second group of proteins related with potassium transport are two transporters, TRK1 and TRK2; (3) the third group are known a new family of outwardly rectifying potassium channel protein with two pore domains in tandem. Molecular Biology, Physiology and Electrophysiological experiments suggest a possible functional relationship among the three groups of proteins mentioned above. A mechanism of potassium transport dynamic across membrane in two species of yeast is proposed.

**Key Words:** Potassium Transport, Transporters, Ionic Channel,  $H^+$  /  $K^+$  interchange, *Saccharomyces cerevisiae*, *Kluyveromyces lactis*.

**RESUMEN.** Los mecanismos de transporte de potasio en la levadura no han sido completamente esclarecidos. Si bien varias proteínas de membrana han sido caracterizadas, el papel de las proteínas involucradas con el movimiento de potasio aun es desconocido. Las levaduras típicamente mantienen una concentración alta de potasio en su interior a través de algunos sistemas de transporte. Tres tipos de proteínas se encuentran relacionados con el transporte de potasio a través de la membrana han sido descritos: (1) la energía necesaria para la acumulación de potasio (150mM) es generada por un gradiente eléctrico mantenido a través de la membrana plasmática por la  $H^+$ -ATPasa; (2) el segundo grupo de proteínas relacionadas con el transporte de potasio son dos transportadores TRK1 y TRK2; (3) el tercer grupo conocido es una nueva familia de canales rectificadores salientes con dos dominios de poro en tándem. Experimentos de Biología Molecular, Fisiología y Electrofisiología sugieren una posible relación entre los tres grupos de proteínas mencionadas con anterioridad. Se propone un mecanismo de la dinámica del transporte de potasio a través de la membrana plasmática de dos especies de levadura.

**Palabras clave.** Transporte de iones, Transportadores, Canales iónicos, Intercambio  $H^+$  /  $K^+$ . *Saccharomyces cerevisiae*, *Kluyveromyces lactis*.

### INTRODUCCIÓN

En el proceso de caracterización de la membrana plasmática de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* se ha encontrado una variedad de proteínas relacionadas con el transporte de solutos y de iones. En este microorganismo, se ha descrito y caracterizado diferentes sistemas de transporte que han servido para estudiar fenómenos relacionados con alteraciones en las proteínas de la membrana plasmática.

El transporte en las membranas está mediado por proteínas, de las cuales hay distintos tipos: canales; facilitado-

res (transportadores, acarreadores y permeasas) y bombas.<sup>20</sup> En esta revisión resaltamos el papel, hasta ahora conocido, de varios tipos de proteínas involucradas con la regulación de los niveles de iones en la levadura *S. cerevisiae*. La primera, además de haber sido la primera proteína clonada, es la  $H^+$ -ATPasa, la cual se encarga de acidificar el medio extracelular bombeando protones.<sup>40</sup> Su actividad genera un gradiente eléctrico a través de la membrana plasmática, el cual impulsa al sistema de proteínas (TRK1 y TRK2), cuya misión principal es la de transportar selectivamente potasio hacia el interior celular con diferentes afinidades.<sup>10,24</sup> Otro tipo de proteínas corresponde a un canal



rectificador saliente de potasio en la membrana plasmática de la levadura, que se encarga de la salida de  $K^+$ .<sup>22</sup> Estudios detallados han demostrado que además de ser activado por la depolarización de la membrana plasmática, también es activado por altas concentraciones de  $Ca^{2+}$  citoplasmático. La función de esta proteína consiste en balancear las cargas durante el desplazamiento de protón acoplado al transporte de solutos.<sup>3</sup> Otro sistema reportado recientemente es el de un intercambiador  $H^+$ /catión, que parece tener un papel en la regulación del pH interno de la levadura.<sup>33</sup>

Por otra parte queremos resaltar la caracterización de otra especie de levadura; *Kluyveromyces lactis*, tiene una sola copia de varios de sus genes. Esto hace de esta especie un organismo más sencillo de estudiar desde el punto de vista genético.

En esta revisión pretendemos plantear las funciones específicas de cada una de las proteínas de membrana plasmática involucradas en la homeostasis del  $K^+$  en las levaduras *S. cerevisiae* y *K. lactis*, así como plantear algunas de las preguntas aún no esclarecidas.

## LOS SISTEMAS DE TRANSPORTE EN LOS ORGANISMOS, ¿QUÉ SON Y CUÁL ES SU PAPEL?

Todos los tipos celulares mantienen en su citoplasma una composición y una concentración de sustancias diferente del medio que las rodea, esto se debe en gran medida a la presencia de la membrana plasmática.

Hay dos tipos de transporte a través de la membrana, el transporte mediado y el no-mediado. El primero ocurre mediante una simple difusión de las moléculas que no tienen carga, y que se "disuelven" en la membrana y difunden libremente de un lado a otro de ella. El segundo ocurre mediante la acción de proteínas transportadoras específicas (que reciben el nombre de permeasas, portadores, translocasas, translocadores y transportadores).<sup>25</sup>

Es sencillo explicar que la membrana celular impida el libre movimiento de macromoléculas; también se puede explicar que las moléculas polares o cargadas deban de mantenerse a un lado o del otro de la membrana, debido a la capa de solvatación que las rodea y aumenta su volumen. Es necesario para la célula que las moléculas o iones que se transporten a través de la membrana de un lado a otro, es decir, desde el lado donde se encuentran en menor concentración hacia aquel que está en mayor concentración.<sup>25</sup>

El transporte a través de la membrana requiere atravesar la doble capa de fosfolípidos que la constituye. Una molécula grande, una molécula pequeña hidratada o un ion requiere de un sistema de transporte o un acarreador o un poro específico, capaces de permitir el paso de un lado a otro de la membrana. Estos sistemas de transporte, antes de permitir el paso de la sustancia deben de reconocerla y distinguirla de un sinnúmero de otras moléculas que se en-

cuentran disueltas en el medio extracelular e intracelular.

**El transporte mediado pasivo o difusión facilitada.** Es un sistema de transporte que consiste en el movimiento de moléculas específicas que fluyen desde una concentración elevada en un lado de la membrana a una concentración baja al otro lado de la membrana, de modo que la tendencia sea a equilibrar los gradientes de concentración. Los translocadores simples o facilitadores mueven sustancia a favor de su gradiente de concentración.<sup>25</sup>

**El transporte activo.** Es aquél en el cual moléculas específicas se transportan desde una concentración baja a una elevada, es decir, en contra de gradiente de concentración. Un proceso endergónico como éste debe de estar acoplado a un proceso suficientemente exergónico para que sea favorable. Muchos de estos eventos se producen utilizando directamente la energía producida por la hidrólisis de ATP. Tal es el caso de las proteínas que mueven iones potasio ( $K^+$ ) a través de la membrana. Este ion se encuentra en concentraciones intracelulares altas con respecto al medio extracelular.<sup>25</sup>

## EL PAPEL DEL POTENCIAL ELECTROQUÍMICO

La difusión de una sustancia a través de una membrana se parece, termodinámicamente hablando, a un equilibrio químico. Una diferencia en las concentraciones de las sustancias entre los dos lados de la membrana genera una diferencia de potencial químico:

$$\Delta G_a = G_a(\text{dentro}) - G_a(\text{fuera}) = RT \ln [(a) \text{ dentro}/(a) \text{ fuera}]$$

donde  $G_a$  es el potencial químico de  $a$ ;  $(a) \text{ dentro}$  y  $(a) \text{ fuera}$  se refieren a las concentraciones de esta especie dentro y fuera de la célula respectivamente;  $R$  es la constante de los gases; y  $T$  es la temperatura en grados Kelvin.

Por consiguiente, si la concentración de  $a$  fuera de la membrana es mayor que la de dentro, para la transferencia de  $a$  de fuera a dentro,  $\Delta G_a$  será negativo y el flujo neto de  $a$  será hacia dentro. Sin embargo, si la concentración de  $a$  es mayor adentro que fuera,  $\Delta G_a$  es positivo y el flujo neto de entrada de  $a$  tendrá lugar sólo si un proceso exergónico, tal como la hidrólisis de ATP, se acopla al mismo para hacer que la energía libre global pase a ser negativa.

Las diferencias de carga que se mueven a través de las membranas generan una diferencia de potencial eléctrico el cual puede ser determinado por la siguiente ecuación:

$$\Delta\psi = \psi(\text{dentro}) - \psi(\text{fuera})$$

donde  $\Delta\psi$  se denomina potencial de membrana;  $\psi(\text{dentro})$ , es el potencial eléctrico del lado interno de la membrana; y  $\psi(\text{fuera})$ , es el potencial eléctrico del lado externo de la membrana

## MECANISMOS GENERALES DE TRANSPORTE

Dentro de los sistemas de transporte mediado, hay diferentes variantes, que fueron propuestas por Mitchell<sup>28</sup> en 1961, para tratar de definir los mecanismos implicados en cada caso.

**Translocadores primarios.** Son aquellos en los cuales el sistema de transporte está ligado directamente a una fuente de energía, como el ATP, o a las diferencias del potencial redox generado entre ambas caras de la membrana celular.

**Translocadores secundarios.** Son aquellos que aprovechan las condiciones existentes de diferencias de concentración de otros iones, o las diferencias del potencial eléctrico establecidas por los translocadores primarios. Dentro de éstos, se reconocen las siguientes categorías:

a) **Uniportador**, que supone el movimiento de una única molécula a la vez. Dentro de esta categoría puede haber el caso de moléculas o iones que se mueven según su diferencia de concentración o por diferencias del potencial eléctrico ambos lados de una membrana Fig. 1.

b) **Simportador**, que transporta simultáneamente dos moléculas o iones que pueden ser diferentes en la misma dirección. Habitualmente, en este caso, se aprovecha que un ion se encuentra a mayor concentración de un lado de una membrana, o es impulsado por una diferencia en el potencial eléctrico a ambos lados de ella, para mover a otra molécula o ion Fig. 1.

c) **Antiportador**, que transporta simultáneamente dos moléculas diferentes en direcciones opuestas. También en este caso, lo habitual es que la energía para el movimiento de una molécula o ion sea proporcionada por la diferencia de concentración o del potencial eléctrico de la membrana Fig. 1.

Cuando se mueven partículas cargadas a través de la membrana, se habla del carácter eléctrico del transporte iónico, que se especifica además como:

a) **Electroneutro** (eléctricamente inexistente), cuando hay una neutralización simultánea de cargas, sea por un importe de iones de carga opuesta o por un antiporte de

carga similar.

b) **Electrogénico**, cuando el proceso de transporte resulta en una separación de cargas a través de la membrana.

c) **Electroforético**, cuando una molécula o ion se mueven de acuerdo con la diferencia del potencial eléctrico a ambos lados de la membrana.

## CANALES IÓNICOS

Como ya se dijo, el paso de iones a través de las membranas biológicas tiene un impedimento físico, ya que por su naturaleza eléctrica y por su capa de hidratación, se verían rechazados por el ambiente hidrofóbico de la bicapa fosfolipídica. Sin embargo, los iones son capaces de transitar a través de las membranas debido a la presencia de proteínas membranales especializadas en dicho movimiento, como los canales iónicos. Estos transportadores permiten una rápida difusión de los iones hacia el interior o exterior celular; diferente de los otros sistemas de transporte por la rapidez con la que permiten el paso, principalmente de iones, aprovechando las diferencias del potencial eléctrico a los lados de una membrana. Como transportadores que son, estas moléculas atraviesan la membrana, y por ello presentan tres dominios estructurales: el citoplasmático, el transmembranal y el extracelular; y un poro por donde pasan los iones. Con base en sus características y modo de acción, los canales iónicos se clasifican en cuatro grandes grupos: los receptores canal, los canales sensibles a voltaje, los canales sensibles a presión y los canales activados por proteínas G que habitualmente están relacionados con hormonas.<sup>20</sup>

Los iones se distribuyen diferencialmente a través de las membranas, dando lugar a la generación de gradientes de naturaleza eléctrica y química. El establecimiento de gradientes tiene una significación biológica dando lugar a un sistema regulatorio de los movimientos intracelulares de los iones a los que se la ha denominado homeostasis iónica celular. De tal manera que en condiciones basales se tiene una concentración mayor de sodio y de calcio en el exte-

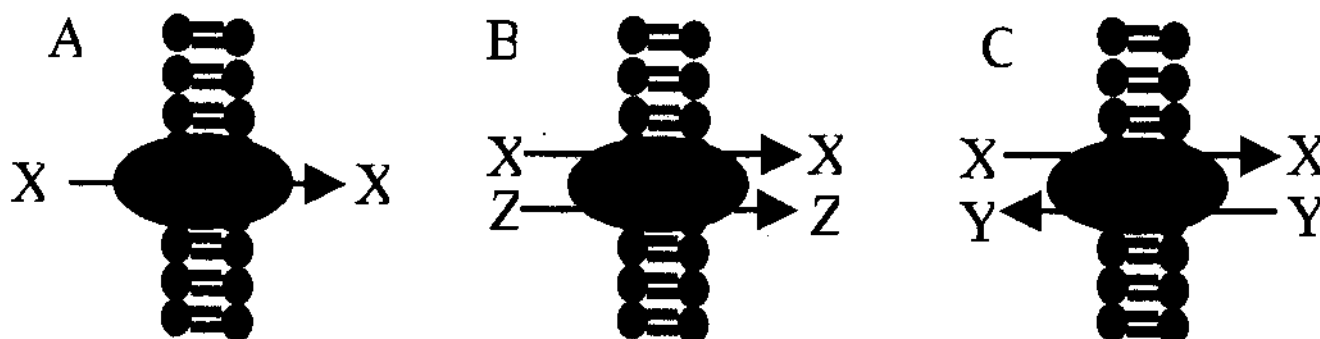


Figura 1. Esquema representativo de translocadores secundarios: Uniportadores (A), Simportadores (B) y Antiportadores (C). Estos se encuentran electrogénicamente asociados con los translocadores primarios que utilizan una fuente de energía tal como el ATP.

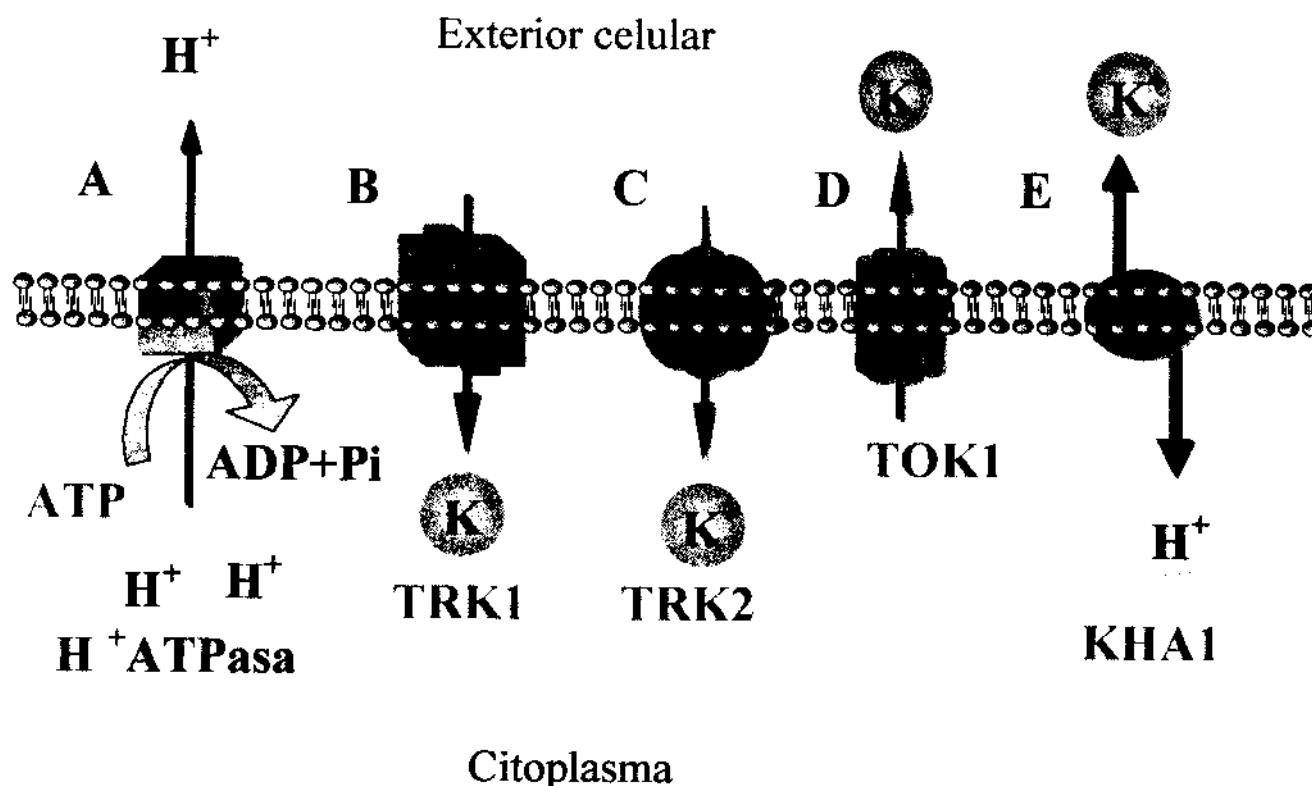


Figura 2. Modelo de membrana plasmática de levadura que involucra proteínas encargadas de la homeostasis del potasio. La  $H^+$  ATPasa (A) se encuentra electrogénicamente acoplada a los sistemas de transporte de potasio TRK1 (B) y TRK2 (C). El canal rectificador saliente TOK1 (D) se encarga de la salida del potasio y finalmente, el intercambiador  $H^+/K^+$  que regula el pH intracelular.

rior celular, mientras que el potasio se encuentra en mayor concentración en el interior.<sup>25</sup>

Una característica importante al estudiar los canales iónicos es la capacidad que tienen para abrir y cerrar el poro (*gating*), ya que un poro abierto tiene una propiedad importante de permeabilidad selectiva, definida directamente con el radio de hidratación de cada ion y con la magnitud del gradiente electroquímico. Pero el "*gating*", además de los elementos estructurales de la proteína que lo representan, se puede analizar desde el punto de vista biofísico, realizando análisis cinéticos, en los cuales se pueden postular estados abiertos, cerrados y de transición. Este se lleva a cabo registrando los cambios que se observan en su capacidad para mover los iones, presentándose como corrientes eléctricas, pero aún contando con la historia de eventos, no es posible predecir el tiempo de apertura y de cierre, ni la magnitud de cada uno de ellos; es decir, los canales tienen un comportamiento que se apeg a un modelo de Markov, en el que se contempla un estado de transición de primer orden. Mediante estos análisis, se encuentra que el tiempo de apertura de un canal puede cambiar por un pequeño pulso, de tal manera que se pueden tener más de un estado abierto; y la transición cerrado-abierto, tiene un curso de

tiempo multiexponencial (varios estados intermedios), de tal manera que se supone la existencia de pasos de primer orden.<sup>20</sup>

#### IMPORTANCIA DEL ESTUDIO DE LOS SISTEMAS DE TRANSPORTE DE IONES, Y EN ESPECIAL DEL $K^+$

Los estudios encaminados a elucidar el mecanismo del transporte de potasio en levadura, fueron iniciados por Conway<sup>9</sup> y Rothstein,<sup>38</sup> quienes presentaron por primera vez pruebas sobre la existencia de un acarreador de cationes, a partir del análisis cinético del transporte. Posteriormente Mitchell,<sup>28</sup> retomó los antecedentes hasta el momento existentes, proponiendo una teoría que en términos simplistas dice "*los cationes pueden penetrar a una estructura aislada por una membrana, solamente si dentro existe un potencial electroquímico negativo con respecto al exterior que provea el impulso requerido para la penetración del ion, el cual en muchos casos se mueve en contra de su gradiente de concentración*". El potasio es uno de estos iones que suele moverse en contra de su gradiente de concentra-

ción, pero a favor de un gradiente electroquímico. Los estudios realizados sobre el movimiento del potasio en las células de levadura han permitido establecer que la cantidad total de este ion que captan, guarda una relación con su concentración externa; es decir, a mayor concentración externa de  $K^+$ , mayor es la cantidad total captada por la célula; pero también, mayor es la cantidad de  $H^+$  expulsada al exterior celular. La comprensión del fenómeno del transporte de cationes, ha llevado al planteamiento de dos cuestiones; la primera se refiere a la posible existencia de un mecanismo de regulación de este sistema de transporte, y segundo, de las posibilidades reales de la existencia de tales sistemas de regulación.

### LOS SISTEMAS PARA EL TRANSPORTE DE $K^+$ EN LA LEVADURA

Fuera de que los sistemas de transporte conocidos están constituidos por proteínas, con que velocidad se mueven y cual es su afinidad por las sustancias que transportan, es poco lo que se sabe acerca de su funcionamiento en detalle.

El tema de la afinidad es importante, pues hay diferencias en los sistemas de transporte en lo que se refiere a la concentración de las sustancias que se transportan. Este asunto toma importancia en el caso de los microorganismos como la levadura, que pueden sobrevivir en medios extremadamente pobres, y para ello necesitan de sistemas de transporte capaces de tomar con gran eficiencia moléculas de materiales nutritivos que requieren para sobrevivir y que se encuentran escasos en el medio. La energía para la acumulación de potasio en la levadura, se deriva del gradiente eléctrico generado a través de la membrana plasmática por la  $H^+$ -ATPasa, lográndose una acumulación de potasio interna de 150 mM. Fig. 2.

En *Saccharomyces cerevisiae* se puede observar que, cuando crece en concentraciones bajas de potasio, expresa un sistema de transporte con una afinidad alta ( $K_m \sim 0.15$  mM). Sin embargo, cuando crece en un medio rico de este catión, el sistema de transporte que utiliza para tomarlo tiene una afinidad menor ( $K_m \sim 6.0$  mM).<sup>37</sup>

Sin embargo, como trataremos más adelante, existe gran controversia alrededor del papel que juega cada proteína en el movimiento del potasio hacia el interior de la levadura. De hecho se ha especulado acerca del papel redundante de dos genes semejantes involucrados; es decir, puede ser que ambos genes en algún momento evolutivo codificaban para la misma proteína.<sup>36</sup>

### SISTEMAS Y MECANISMOS PROPUESTOS

**Identificación de las proteínas implicadas y construcción de las primeras mutantes.** En la membrana plasmática de la levadura el sistema de transporte de  $H^+$  está ligado al de  $K^+$ , por lo que se ha concluido que en la mem-

brana plasmática de la levadura se utiliza ATP como fuente de energía,<sup>30</sup> según el esquema de la figura 2.

SISTEMA	CONSTANTE CINÉTICA	$^{86}Rb$	$^{42}K$
Alta Afinidad	$K_m$ ( $\mu M$ )	150	24
	$V_{max}$ (nmolas/min/mg)	21	34
Baja Afinidad	$K_m$ ( $\mu M$ )	6	2
	$V_{max}$ (nmolas/min/mg)	6	7

brana plasmática de la levadura se utiliza ATP como fuente de energía,<sup>30</sup> según el esquema de la figura 2.

Se propuso que la levadura tiene un translocador primario, que consiste en una ATPasa (molécula que rompe ATP), que con la energía producida por la ruptura del ATP es capaz de bombear protones (iones de hidrógeno) al exterior de la célula, generando por una parte una diferencia de concentraciones de iones hidrógeno en el exterior, más ácido, que en el interior (más alcalino). Pero además, dado que los protones tienen carga positiva, se genera una diferencia de potencial eléctrico entre el exterior, más positivo, que en el interior (más negativo). Esta diferencia de potencial es el factor que impulsa a los iones  $K^+$  hacia el interior, gracias a la presencia de un uniportador más o menos específico para este ion, pero que puede mover, con menos afinidad, a otros cationes monovalentes.<sup>4</sup>

La ATPasa de protones ( $H^+$ -ATPasa) fue aislada y reconstituida en liposomas preparados con lectina, y el gen que la codifica fue clonado y definida su secuencia.<sup>41,42</sup>

En 1984, Rodríguez Navarro y colaboradores encontraron que *S. cerevisiae* crecidas en ausencia de  $Na^+$  y  $NH_4^+$ , se expresan dos sistemas de transporte de  $K^+$  diferentes Tabla 1.

Tal descubrimiento llevó a estos autores a proponer la existencia de un sistema de transporte de  $K^+$  interconvertible, que pudiera operar con dos afinidades diferentes; o bien, dos sistemas de transporte independientes, uno de alta y otro de baja afinidad para el ion potasio.<sup>37</sup>

En 1985, el grupo de Rodríguez-Navarro obtuvo una mutante de *S. cerevisiae* deficiente en el transporte de po-



tasio de alta afinidad, lo que demostró la existencia de dos sistemas de transporte de  $K^+$  independientes o bien, como ya se dijo, la hipótesis sobre un sistema interconvertible para el transporte de potasio con dos afinidades diferentes.<sup>35</sup> Otros estudios en sistemas procariontes y eucariontes han demostrado que el potasio se transporta por sistemas múltiples, funcionalmente independientes y que tienen diferentes afinidades por cada catión.

En 1988 el grupo de Gaber, clonó y secuenció el gen *TRK1* de *S. cerevisiae*, planteándose como el responsable del sistema de transporte de alta afinidad.<sup>10</sup> Partiendo del hecho de que el sistema de transporte de potasio está acoplado electrogénicamente con el bombeo de protones<sup>30</sup> y de la clonación de *TRK1*, se demostró contundentemente que el transportador y la  $H^+$ ATPasa son diferentes proteínas. De aquí se desprende la primera conclusión importante: existe una independencia física y funcional de los sistemas de transporte de potasio y el bombeo de protones.

Para 1990, el grupo de Gaber reportó la secuencia del gen *TRK 2* como el responsable del sistema de transporte de potasio de baja afinidad, pues al crear una doble mutante de los dos transportadores de potasio, la levadura sólo es capaz de crecer a partir de concentraciones de potasio de 100 mM.<sup>11</sup> Las mutantes mostraron hipersensibilidad a pH bajo que puede ser suprimida por altas concentraciones de potasio pero no de  $Na^+$ . El gen *TRK-1* suprime los defectos en el transporte y la hipersensibilidad al pH. El gen *TRK-2* codifica; por similitud, para un transportador de potasio similar a *TRK-1* con 12 dominios transmembranales y una región hidrofóbica grande.<sup>24</sup>

En 1994 Ramos y colaboradores, proponen que el *TRK2* no es un componente de baja afinidad para el transporte de potasio en la levadura *S. cerevisiae*. Con base en estudios cinéticos de transporte de  $^{86}Rb$ , se analizaron las mutantes *trk1 TRK2*, *trk1 TRK2<sup>D</sup>* (sobrexpresado) y *trk1 trk2*, revelando que el *TRK 2* presenta moderada afinidad por el  $^{86}Rb$ . Cuando se realiza un ayuno de  $K^+$  la mutante *trk 1 TRK 2*, las células muestran un componente de baja afinidad y uno de moderada afinidad con una  $V_{max}$  muy baja. Por otra parte, las células que sobreexpresan el producto del gen *TRK2* en la mutante *trk1 TRK2<sup>D</sup>*, incrementan la  $V_{max}$  del componente de moderada afinidad y dicho componente desaparece en la doble mutante *trk1 trk2*. En contraste, en la mutante *trk1 TRK 2* la salida de  $^{86}Rb$  no se ve afectada por mutaciones en *TRK 2*. Congruente con los diferentes niveles de actividad del componente de moderada afinidad en la salida de  $^{86}Rb$ , la mutante *trk1 TRK2* crece lentamente en concentraciones micromolares de potasio, mientras que las células de la mutante *trk1 TRK2<sup>D</sup>* las células crecen rápidamente, y en la doble mutante *trk1 trk2* hay un crecimiento pobre. Actualmente se discute la existencia de un sistema único en el transporte de  $K^+$  compuesto por varias proteínas.<sup>36</sup>

Miranda y colaboradores en 1995, demostraron en la levadura *K. lactis*, a través de la clonación de la  $H^+$ ATPasa, la dependencia del transporte de potasio con el

potencial de membrana, pues una mutante carente de transportador de potasio cuenta con una actividad de ATPasa igual que la cepa silvestre; mientras que una mutante de la  $H^+$ ATPasa presenta una deficiencia en el transporte de potasio.<sup>27</sup>

**Las secuencias de las  $H^+$ ATPasas.** El primer gen de  $H^+$ ATPasas de hongos reportado fue el de *S. cerevisiae* denominado como *PMA 1*; de este gen se encontró otra copia en esta levadura (*PMA 2*).<sup>40</sup> Posteriormente se determinó la secuencia del gen homólogo de *Neurospora crassa*,<sup>16</sup> que mostró alto grado de similitud con las secuencias de los genes *PMA1* y *PMA2* *S. cerevisiae*. Utilizando como sonda la ATPasa de *S. cerevisiae*, se identificaron otras ATPasas por hibridaciones con bibliotecas genómicas de *Schizosaccharomyces pombe*,<sup>13</sup> *Zygomycetes rouxii*<sup>47</sup> y *Candida albicans*.<sup>29</sup>

**Las secuencias de los TRK's.** En 1988 se clonó y se secuenció el gen que codifica para el acarreador de alta afinidad *TRK-1* en *S. cerevisiae*, demostrando la independencia física y funcional del sistema de transporte de potasio y de protones.<sup>10</sup> Posteriormente por hibridación, utilizando como sonda el gen *TRK-1* de *S. cerevisiae* se identificaron secuencias con similitudes en el genoma de la mayoría de las especies de *Saccharomyces* y se clonó el gen *TRK-1* de *Saccharomyces uvarum*<sup>1</sup> y *S. pombe*,<sup>44</sup> encontrándose que confiere un transporte de alta afinidad al igual que el de *S. cerevisiae*. Ambos genes tienen secuencias con 86 % de similitud con *TRK 1* de *S. cerevisiae*.<sup>11</sup> En nuestro grupo de trabajo estamos caracterizando el gen homólogo *TRK1* en la levadura *K. lactis*, el cuál presenta una identidad alta con respecto a los ya clonados y secuenciados Fig. 3.

En 1991, Haro y colaboradores señalaron que el *TRK-1*, puede ser un componente regulador del sistema del transporte de potasio de *S. cerevisiae* y que se requiere para potenciar el influjo de potasio por la disminución del pH interno.<sup>19</sup>

El descubrimiento de que el *TRK-1* y *TRK-2* codifican para transportadores de potasio estructuralmente homólogos, así como son los dos genes *PMA-1* y *PMA-2* que codifican para bombas de protones en *S. cerevisiae*,<sup>43</sup> haría pensar que el *TRK-2* pudiera ser un regulador de transporte.<sup>36</sup>

*S. cerevisiae* con eliminación de los genes *TRK1* y *TRK2* requiere de 100 mM de potasio para poder crecer, lo cual ha sugerido la probable existencia de otro u otros transportadores. Se han identificado mutaciones supresoras (designadas *RPD*) en *Δtrk1 Δtrk2*, restableciéndose el sistema de transporte de potasio. Dichas mutaciones supresoras se seleccionaron por la capacidad de permitir el crecimiento en baja concentración de potasio (7 mM, pH 5.9); y por supresión del fenotipo a pH bajo y alta concentración de potasio (pH 3.0, 100 mM). La selección directa por supresión del defecto en el transporte de potasio ha dado la pauta para obtener nueva información a cerca de la función de otras proteínas en el transporte de potasio en la levadu-

Figura 3. Homología entre las proteínas transportadoras de potasio TRK de las levaduras *Saccharomyces cerevisiae* (Sctrk1 y 2); *Saccharomyces uvarum* (Sutrkl); *Schizosaccharomyces pombe* (Sptrkl) y *Kluyveromyces lactis* (Kltrkl).

	Sctrk1	Sctrk2	Sutrkl	Sptrkl	Kltrkl
Sctrk1	100	71.4	87.7	59.7	69.5
Sctrk2	55.9	100	71.6	58.3	63.0
Sutrkl	79.6	55.1	100	61.8	68.5
Sptrkl	39.4	38.4	39.4	100	54.2
Kltrkl	51.0	44.2	50.6	32.9	100
	%Similitud				
	%Identidad				

ra. La secuenciación de las mutantes supresoras han mostrado un alto porcentaje (86% de identidad de aminoácidos) con proteínas involucradas en el transporte de carbohidratos. Estos resultados sugieren que el transporte de potasio puede deberse a un incremento en la permeabilidad de la membrana cuando los transportadores están realizando el transporte de glucosa y los iones se mueven por este medio de manera inespecífica.<sup>12</sup>

En 1991 Peña y Ramírez, demostraron que en mutantes de levadura del sistema de alta afinidad, la adición de glucosa provoca una salida de cationes monovalentes, que se acelera notablemente por cationes trivalentes como el  $Tb^{3+}$ . Con el uso de este tipo de mutantes se ha visto que la salida de potasio espontánea requiere de sustratos como glucosa o etanol. Estos resultados demuestran que la salida de potasio se realiza por proteínas diferentes a las codificadas por los genes *TRK1* y *TRK2*.<sup>31</sup>

En nuestro grupo de trabajo, hemos caracterizado el transporte de potasio en *K. lactis* demostrándose cinéticamente; mediante el uso del isótopo  $^{86}Rb$ , la existencia de sólo un sistema de transporte de potasio, similar al de alta afinidad de *S. cerevisiae* (Datos no publicados).

Por otra parte, por hibridaciones heterólogas hemos clonado y secuenciado el gen responsable de dicho transporte; el gen homólogo *KITRK1*, que de igual manera tiene una alta similitud e identidad con los otros "TRK's". La construcción de una mutante inactivadora del gen, muestra un fenotipo donde no hay transporte de potasio; mientras que en cajas de cultivo para medios de selección requiere de un mínimo de 5 mM de  $K^+$  para crecer. Por otra parte, la actividad de la  $H^+$ -ATPasa de la cepa mutante  $\Delta Kltrkl$  no muestra diferencias significativas con respecto a la cepa silvestre, por lo cual se ha podido concluir que el fenotipo

de la mutante es defecto en el transportador de potasio y no un defecto en la actividad de la  $H^+$ -ATPasa (Datos no publicados).

De estos resultados sugieren aparentemente que se trata de un sólo sistema de transporte, ya que un análisis de las constantes cinéticas revelan que para la expresión del sistema de alta y baja afinidad, los valores son prácticamente los mismos en la cepa silvestre. Por su parte, en la cepa interrumpida presenta una pérdida de afinidad y una consecuente disminución en la velocidad máxima de transporte.

**Canales de  $K^+$  y el caso de la levadura.** Los canales de potasio son proteínas ubicuas en los organismos vivos, que se encuentran en bacterias, levaduras, plantas y animales y exhiben una gran heterogeneidad estructural. Estos canales contribuyen al control de flujo de  $K^+$  y del volumen celular, participan en la liberación de hormonas y transmisores, al restablecimiento del potencial de membrana, así como a la excitabilidad de músculos y neuronas.<sup>20</sup>

Los canales de potasio pueden ser regulados por cambios en el potencial de membrana o por el estado metabólico de la célula, o bien por hormonas y transmisores.<sup>20</sup>

Últimamente se clasifican los canales de potasio con base motivos estructurales conservados que puedan estar involucrados en la actividad del canal. Este tipo de clasificaciones se lleva a cabo debido a que las propiedades de selectividad de cada canal, se pueden modificarse por mutaciones que cambian la selectividad iónica.<sup>20</sup>

La clonación y secuenciación de canales de potasio han revelado la existencia de una familia de canales de potasio dependientes de voltaje (*voltage-gate  $K^+$  channel*) y la familia de los canales rectificadores de entrada de potasio (*Inward Rectifier  $K^+$  channel*). Los canales de potasio dependientes de voltaje y los canales de potasio activados por calcio, contienen seis probables segmentos transmembranales (S1-S6) cada uno en subunidades  $\alpha$ , o también conocidas como dominios de selectividad iónica. Las subunidades  $\beta$  de los canales voltajes dependientes, tienen motivos potenciales para la unión de nucleótidos, por ejemplo NAD (P)H. Los canales de potasio rectificadores entrantes aparecen relacionados distantemente de los canales de potasio voltaje dependiente y presentan sólo dos probables segmentos transmembranales (M1, M2) en  $\alpha$  subunidades cada uno. Las subunidades  $\beta$  de canales rectificadores entrantes de potasio y los canales de potasio ATP-sensibles, contienen múltiples segmentos transmembranales probables y dos dominios de unión de nucleótidos que los relaciona con la superfamilia de los transportadores ABC, que tienen una región específica para unir ATP.<sup>21</sup>

Las proteínas codificadas por genes *TRK1* y *TRK2*, contienen múltiples regiones hidrófobas con semejanza a los transportadores ABC. La remoción de estas proteínas elimina la corriente rectificadora entrante de potasio.<sup>7</sup> Si bien, no se conoce algún gen que codifique para un canal de rectificación entrante de potasio en *S. cerevisiae*, este hecho ha servido para clonar genes de éste tipo por complementación de la mutante ya mencionada.





Ya se ha hablado de que los canales iónicos son proteínas, o bien complejos de proteínas en la membrana y que media el transporte pasivo de iones a través de la formación de un poro acuoso de difusión. Actualmente se manejan dos características principales para los canales: la primera es que los iones se mueven a través de ellos extremadamente rápido ( $\sim 10^6$  iones/seg); y la segunda que la apertura y cierre de los canales está regulada por cambios en el potencial de membrana debido a unión de ligandos específicos, o bien por cambios en la fluidez de la membrana plasmática.<sup>25</sup>

La caracterización de la salida de iones en la levadura se ha realizado y registrado de diferentes maneras. Pero no fue sino hasta 1995 que se reportó un gen responsable de la salida de  $K^+$  que codifica para una proteína de tipo canal. Se describió como una nueva familia de canales de potasio rectificador saliente (TOKI) cuya característica principal es que presenta dos regiones de poro en tándem.<sup>22</sup> Ese mismo año, Xin-Liang Zhou y colaboradores, describieron a este mismo gen como el codificador responsable de un canal de potasio de membrana plasmática de levadura, activado por depolarización. El gen fue nombrado por éste grupo como *YKC1*.<sup>48</sup>

El canal rectificador saliente de potasio en la membrana plasmática de la levadura es el encargado de la salida de  $K^+$ . Otros estudios han demostrado que también es activado por altas concentraciones de  $Ca^{2+}$  citoplasmático y que la función de ésta proteína, muy probablemente sea mantener el balance de carga durante el desplazamiento de protón acoplado al transporte de sustratos.<sup>6,17</sup>

Gustin y colaboradores en 1988, mostraron que en la membrana plasmática de la levadura existe actividad de un canal que tiene conductancias para aniones y cationes. Este canal se caracterizó como mecanosensible y juega un papel en la osmoregulación, permitiendo la salida de iones en condiciones de estrés osmótico.<sup>18</sup>

La secuenciación del genoma de *S. cerevisiae* reveló que en el brazo izquierdo del cromosoma X hay dos nuevos marcos de lectura abiertos; uno de ellos, el J0911, al ser removido en la levadura no afectó la viabilidad de las células y no se apreciaron otros efectos sobre los fenotipos bajo las condiciones registradas.<sup>26</sup>

El canal TOKI presenta una estructura topológica característica de los canales de  $K^+$  voltaje dependiente. La traducción de este marco de lectura reveló una proteína hipotética con dos dominios de poro (*P-like domain*), cada uno constituido por un octapéptido (P1: SLLTVGLG; P2: CLLTIGYG). El análisis de hidropatía demuestra ocho hélices potencialmente transmembranales (S1-S8), con regiones de poro entre S5 y S6 y una región adicional de poro entre S7 y S8. Existe una aparente homología en las secuencias de los segmentos hidrofóbicos contiguos a cada región de poro y el dominio S6 es similar al de los canales de potasio.<sup>22</sup>

Con base al uso de codones para este gen (*low codon bias index CBI*  $\sim 0.055$ ), se sugiere que se expresa en bajos

niveles. Es posible por tanto, que el número de canales en la membrana plasmática por célula sea relativamente bajo y se estima este intervalo entre 10 a 40-50 copias.<sup>7,17</sup>

Actualmente, se considera necesario realizar más experimentos para determinar el papel del canal rectificador saliente en la membrana plasmática de la levadura, pues sólo se ha especulado sobre la probable función, y no existe hasta el momento una explicación contundente que responda a la presencia del canal que medie la salida de  $K^+$ .<sup>3</sup>

Hasta hace poco se pensaba que un canal, con las características antes mencionadas, era exclusivo de células y de tejidos excitables, pero el hecho de encontrarlos en la levadura ha sido un descubrimiento que no deja de sorprender, pues ¿cuál es su función específica en la levadura? Aunque se ha especulado que los canales rectificadores salientes que presentan dos regiones de poro en tándem encontrados en células animales son los responsables de la salida del potasio, y que es precisamente esta característica de doble poro la que hace que tenga una direccionalidad funcional, no se conoce todavía su papel fundamental. Sin embargo nosotros consideramos que es prematuro concluir que todos los canales con este tipo de comportamiento y con esas características estructurales produzcan un fenotipo de rectificación saliente.

**Intercambio  $H^+ / K^+$ .** En la levadura, el transporte de potasio hacia el interior celular, es un proceso que está controlado por dos factores primarios: la diferencia de potencial y el gradiente de pH generado por la  $H^+$ -ATPasa.

En vesículas de membrana plasmática de levadura y fosfatidilcolina, la adición de ATP conduce a la acumulación de protones dentro de ellas. Aunado a esto, se produce la entrada de  $^{86}Rb$  aparentemente a favor de la diferencia del potencial electroquímico. De esta manera se ha propuesto la existencia de un sistema de intercambio  $H^+ / K^+$ .<sup>33</sup>

El papel de este intercambiador en la levadura, muy probablemente esté involucrado en la regulación del pH interno de la célula. Es conocido que los iones  $K^+$  producen indirectamente, un incremento en el bombeo de  $H^+$ , produciendo entonces un incremento del pH interno de la célula. Ahora bien, este sistema de intercambio  $H^+ / K^+$  se sugiere como un mecanismo de seguridad en caso de una excesiva alcalinización del interior celular.<sup>33</sup>

El gen *KHA1* corresponde a un marco de lectura (YJL094c) que codifica para un probable intercambiador  $K^+ / H^+$  en *S. cerevisiae*. La interrupción de este gen por recombinación homóloga, presenta un incremento de la concentración de potasio en el interior celular. Cinéticas de transporte de  $^{86}Rb$  mostraron el mismo sistema de saturación para la silvestre y la mutante interrumpida. Las células mutantes acidifican más el medio extracelular y presentan una alcalinización del medio intracelular mayor con respecto a las células silvestres. Estudios de citometría de flujo han mostrado un incremento en la duplicación del DNA de las células mutantes con respecto a las silvestres.<sup>34</sup> Células mutantes de *Kha1* producen una gran acidificación consistente con una alcalinización del medio intra-





celular aunado a una alta velocidad de consumo de oxígeno. Se especula que la alta acumulación de potasio y el incremento de la presión osmótica aceleren el ciclo celular y la actividad metabólica.

## CLONACIÓN POR COMPLEMENTACIÓN

Uno de los métodos más eficientes para clonar genes relacionados con el movimiento de potasio a través de la membrana plasmática ha sido la clonación por complementación de mutantes de levadura. Esta sección no pretende describir protocolos detallados de cómo se han llevado a cabo la clonación de algunos genes, pero consideramos que es relevante mencionarlos ya que la levadura ha demostrado ser un buen modelo para describir y caracterizar nuevos elementos genéticos de organismos eucarionte y procariontes relacionados con la homeostasis de dicho catión.

En 1992 Anderson y col., reportaron el primer canal iónico (*KAT1*) plantas aislándolo de un banco de cDNA, de *Arabidopsis thaliana*, que suprimía totalmente el defecto de transporte de potasio de la doble mutante  $\Delta trk1 \Delta trk2$  de *S. cerevisiae*.<sup>2</sup>

En 1992, Hervé Sentenac y col., clonaron y expresaron en levadura de un sistema de transporte de potasio de *A. thaliana*; la complementación se realizó en la mutante de *S. cerevisiae*  $\Delta trk1$  clonándose el gen *AKT1*.<sup>39</sup>

Uozumi y colaboradores en 1995 realizaron mutagénesis al azar en el motivo estructural GYG del gen *KAT1* que corresponde a la región de poro y que al ser modificado provoca cambios en la selectividad por potasio.<sup>46</sup>

Se ha clonado un canal (*ORK1*) de escape selectivo para potasio de *Drosophila melanogaster* por expresión en *S. cerevisiae* en la cepa  $\Delta trk1 \Delta trk2$ , en la cual confiere capacidad para transportar potasio cuando es expresado heterológicamente.<sup>15</sup>

También se han podido clonar genes que codifican para proteínas de tipo canal de organismos más complejos como son los vertebrados. Tal es el caso del grupo de Tang que en 1995 clonaron por expresión funcional un canal Rectificado entrante de  $K^+$  (*gpiRK1*) en levadura, utilizando la cepa  $\Delta trk1 \Delta trk2$  como receptora.<sup>45</sup>

Se ha clonado el gen *HAK1* de la levadura *Schwanniomyces occidentalis*, que confiere la capacidad para crecer en medios bajos en  $K^+$  de *S. cerevisiae*  $\Delta trk1$  y  $\Delta trk2$ .<sup>5</sup>

Périer y colaboradores en 1995 clonaron y secuenciaron una probable ATPasa de la familia Clp/HSP104 (*SKD3*). Este suceso constituye el punto de partida para la clonación de nuevos miembros de las familias de ATPasas.<sup>32</sup>

## AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue apoyado por los proyectos: IN207696

de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico de la Universidad Nacional Autónoma de México. 400346-5-3282PN del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, México.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Anderson, J. A., L. A. Best y R. F. Gaber. 1991. Structural and functional conservation between the high-affinity  $K^+$  transporters of *Saccharomyces uvarum* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene*. 99:39-46.
2. Anderson, J. A., S. S. Huprikar, L. V. Kochian, W. J. Lucas, y R. F. Gaber. 1992. Functional expression of a probable *Arabidopsis thaliana* potassium channel in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 89:3736-40.
3. André, B. 1995. An overview of membrane transport protein in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 11:1575-1611.
4. Armstrong, A. y A. Rothstein. 1964. Discrimination between alkali metal cations by yeast. *J. Gen. Physiol.* 48:61-71.
5. Bafielos, M. A., R. D. Klein, J. Alexander-Bowman y A. Rodríguez-Navarro. 1995. A potassium transporter of the yeast *Schwanniomyces occidentalis* homologous to the *Kup* system of *Escherichia coli* has a high concentrative capacity. *EMBO J.* 14:3021-3027.
6. Bertl, A., C. L. Slayman y D. Gradmann. 1993. Gatin and conductance in an outward-rectifying  $K^+$  channel from the plasma membrane of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Membr. Biol.* 132:183-199.
7. 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 channel and carriers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 92:2701-2705.
8. Clayton, R., O. White, K. A. Ketchum y J. C. Venter. 1997. The first genome from the third domain of life. *Nature*. 387:459-462.
9. Conway, E. J. y O. Malley E. 1946. The nature of the cation exchange during yeast fermentation with formation of 0.02 N H-ion. *Biochem J.* 40:59.
10. Gaber, R. F., C. A. Styles y G. R. Fink. 1988. *Trk1* encodes a plasma membrane protein required for high-affinity potassium transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 8:2848-2859.
11. Gaber, R. F., M. C. Kielland-Brandt y G. R. Fink. 1990. *Hol1* mutations confer novel ion transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 10:643-652.
12. Gaber, R. F. 1992. Molecular genetics of yeast ion transport. *Int. Rev. Cytol.* 137:299-353.
13. Ghislain, M., A. Sclesser y A. Goffeau. 1987. Mutation of a conserved glycine residue modifies the vanadate



- sensitivity of the plasma membrane  $H^+$ -ATPase from *Schizosaccharomyces pombe*. J. Biol. Chem. 262:17549-17555.
14. Goffeau, A. y C. W. Slayman. 1981. The proton-translocating ATPase of the fungal plasma membrane. Biochim. Biophys. Acta. 639:197-223.
  15. Goldstein, S. A. N., L. A. Price, D. N. Rosenthal y M. H. Pausch. 1996. *ORK1*, a potassium-selective leak channel with two pore domains cloned from *Drosophila melanogaster* by expression in *Saccharomyces cerevisiae*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 93:13256-13261.
  16. Goormaghtigh, E., C. Chadwick y G. A. Scarborough. 1986. Monomers of the *Neurospora* plasma membrane  $H^+$ -ATPase catalyze efficient proton translocation. J. Biol. Chem. 261:7466-7471.
  17. Gustin, M. C., B. Martinac, Y. Saimi, M. R. Culbertson y C. Kung. 1986. Ion channels in yeast. Science 233:1195-1197.
  18. Gustin, M. C., X. L. Zhou, B. Martinac y C. Kung. 1988. A mechanosensitive ion channel in the yeast plasma membrane. Science 242:762-765.
  19. Haro, R., B. Garciadeblas y A. Rodríguez-Navarro. 1991. A novel P-type ATPase from yeast involved in sodium transport. FEBS-Lett. 291:189-91.
  20. Hille, B. 1992. Ionic channels of excitable membranes. (Sinauer Sunderland, MA).
  21. Jan, L. Y. y Y. N. Jan. 1997. Cloned potassium channels from eukaryotes and prokaryotes. Annu. Rev. Neurosci. 20:91-123.
  22. 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 protein with two pore domains in tandem. Nature 376:690-695.
  23. Kreger-van Rij, N. J. W. 1986. The yeast: A taxonomic study. Elsevier Science Publishers. New York. N. Y. 517 pp.
  24. Ko, C. H., A. Buckley y R. F. Gaber. 1990. *TRK2* is required for low affinity  $K^+$  transport in *Saccharomyces cerevisiae*. Genetics 125:305-312.
  25. Latorre, R. 1996. Biofísica y fisiología celular. Universidad de Sevilla.
  26. Miosga, T., A. Witzel y F. K. Zimmermann. 1994. Sequence and function analysis of a 9.46 Kb fragment of *Saccharomyces cerevisiae* chromosome X. Yeast 10:965-973.
  27. Miranda, M., J. Ramírez, A. Peña y R. Coria. 1995. Molecular cloning of the plasma membrane  $H^+$ -ATPase from *Kluyveromyces fragilis*: a single nucleotide substitution in the gene confers ethidium bromide resistance and deficiency in  $K^+$  uptake. J. Bacteriol. 177:2360-2367.
  28. Mitchell, P. 1961. Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transport by a chemiosmotic type of mechanism. Nature 191:144.
  29. Monk, B. C. y D. S. Perlin. 1984. Fungal plasma membrane proton pumps as promising in baker's yeast. J. Cell. Microbiol. 20:209-223.
  30. Peña, A., G. Cinco, A. Gómez-Puyou y M. Tuena. 1972. Effect of the pH on the incubation medium on glycolysis and respiration in *Saccharomyces cerevisiae*. Arch. Biochem. Biophys. 153:413-425.
  31. Peña, A. y J. Ramírez. 1991. An energy-dependent efflux system for ions in yeast. Biochim. Biophys. Acta. 1068:237-244.
  32. Périer, F., C. M. Radeke, F. Raab-Graham y C. A. Vandenberg. 1995. Expression of a putative ATPase suppresses the growth defect of a yeast potassium transport mutant: identification of a mammalian member of the Clp/HSP104 family. Gene 152:157-163.
  33. Ramírez, J., A. Peña y M. Montero-Lomelí. 1996.  $H^+$ / $K^+$  exchanger in reconstituted yeast plasma membrane vesicles. Biochim. Biophys. Acta. 1285:175-182.
  34. Ramírez, J., O. Ramírez, C. Saldaña, R. Coria y A. Peña. 1998. A *Saccharomyces cerevisiae* mutant lacking a  $K^+$ / $H^+$  exchanger. J. Bacteriol. 180:5860-5865.
  35. Ramos, J., P. Contreras y A. Rodríguez-Navarro. 1985. A potassium transport mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. Arch. Microbiol. 143:88-93.
  36. Rodríguez-Navarro, A. y J. Ramos. 1984. Dual system for potassium transport in *Saccharomyces cerevisiae*. J. Bacteriol. 159: 940-945.
  37. Ramos, J., R. Alijo, R. Haro y A. Rodríguez-Navarro. 1994. *TRK2* is not a low-affinity potassium transporter in *Saccharomyces cerevisiae*. J. Bacteriol. 176:249-252.
  38. Rothstein, A. y L. H. Enns. 1946. The relationship of potassium to carbohydrate metabolism in baker's yeast. J. Cell. Comp. Physiol. 28:231-252.
  39. Sentenac, H., N. Bonneaud, M. Minet, L. Lacroute, J.-M. Salmon, F. Gaymard y C. Grignon. 1992. Cloning and expression in yeast of plant potassium ion transport system. Science 256:223-225.
  40. Serrano, R. 1985. Plasma membrane ATPase of plant and fungi. CRC. Press USA. 179 p.
  41. Serrano, R. Kielland-Brand. 1986. PMA1, the gene for yeast plasma membrane ATPase. 13<sup>th</sup> Int. Conf. on yeast genetics and molecular biology.
  42. Serrano, R. Kielland-Brand y G. F. Fink. 1986. Yeast plasma membrane ATPase is essential for growth and has homology with ( $Na^+$ - $K^+$ )  $K^+$  and  $Ca^{2+}$ -ATPase. Nature. 319:689-693.
  43. Schlesser, A., S. Ulaszowski, M. Ghislain y A. Goffeau. 1988. A second ATPase gene in *Saccharomyces cerevisiae*. J. Biol. Chem. 263:19480-19487.
  44. Soldatenkov, V., J. A. Velasco, A. M. Avila, A. Dritschilo y V. Notario. 1995. Isolation and characterization of *SpTRK*, a gene from *Schizosaccharomyces pombe* predicted to encode a  $K^+$  transporter protein. Gene. 161:97-101.
  45. Tang, W., A. Ruknudin, W.-P. Yang, S.-Y. Shaw, A. Knickerbocker y S. Kurtz. 1995. Functional expression of a vertebrate inwardly rectifying  $K^+$  channel in yeast. Mol. Biol. Cell. 6: 1231-1240.
  46. Uozumi, N., W. Gassmann, Y. Cao y J. Schroeder.



1995. Identification of strong modifications in cation selectivity in an *Arabidopsis* inwardly rectifying potassium channel by mutant selection in yeast. *J. Biol. Chem.* 270:24276-24281.
47. Watanabe, Y., S. Tamai, T. Nishi y T. Yagi. 1995. Efflux of sodium ions by a  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  antiporter during salt stresses in the salt-tolerant yeast *Zygosaccharomyces rouxii*. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 41:87-97.
48. Zhou, X-L., B. Vaillant, S. H. Loukin, C. Kung y Y. Saimi. 1995. *YKC1* encodes the polarization-activated  $\text{K}^+$  channel in the plasma membrane of the yeast. *FEBS-Letters* 373:170.