

**UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA**  
**Escuela Técnica Superior de Ingenieros**  
**Agrónomos y de Montes**



UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA

**HOMEOSTASIS DE CATIONES EN *Saccharomyces cerevisiae*:**  
**DISTRIBUCIÓN SUBCELULAR DE POTASIO Y SODIO Y FUNCIÓN DE**  
**Trk EN LA ADAPTACIÓN A CAMBIOS EN EL POTASIO EXTERNO**

**TESIS DOCTORAL**

**Rito Humberto Herrera Vega**  
**Córdoba, Noviembre 2013**

TITULO: *Homeostasis de cationes en Sccharomyces cerevisiae: distribución subcelular de potasio y sodio y función de Trk en la adaptación a cambios en el potasio externo*

AUTOR: *Rito Humberto Herrera Vega*

---

© Edita: Servicio de Publicaciones de la Universidad de Córdoba. 2013  
Campus de Rabanales  
Ctra. Nacional IV, Km. 396 A  
14071 Córdoba

[www.uco.es/publicaciones](http://www.uco.es/publicaciones)  
[publicaciones@uco.es](mailto:publicaciones@uco.es)

---

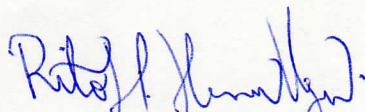


**UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA**

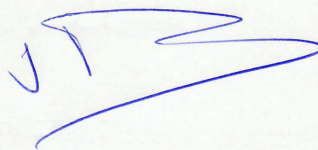
**Departamento de Microbiología**

**HOMEOSTASIS DE CATIONES EN *Saccharomyces cerevisiae*:  
DISTRIBUCIÓN SUBCELULAR DE POTASIO Y SODIO Y FUNCIÓN DE  
Trk EN LA ADAPTACIÓN A CAMBIOS EN EL POTASIO EXTERNO**

**Trabajo presentado por Rito Humberto Herrera Vega para la  
obtención del título de Doctor en Biología**



**El Doctorando**



**El Director**

**Rito Humberto Herrera Vega    Dr. José Ramos Ruíz**

**Córdoba, Noviembre de 2013**

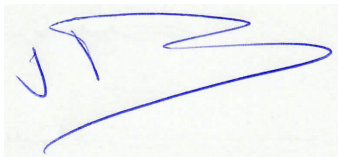


JOSÉ RAMOS RUÍZ, Catedrático de Microbiología de la Universidad de Córdoba

INFORMA

Que el presente trabajo, titulado "HOMEOSTASIS DE CATIONES EN *Saccharomyces cerevisiae*: DISTRIBUCIÓN SUBCELULAR DE POTASIO Y SODIO Y FUNCIÓN DE Trk EN LA ADAPTACIÓN A CAMBIOS EN EL POTASIO EXTERNO", ha sido realizado bajo mi dirección por Don Rito Humberto Herrera Vega en el Departamento de Microbiología de la Universidad de Córdoba, y reúne todos los requisitos para la obtención del Grado de Doctor en Biología.

Y que para así conste, firmo el presente informe en Córdoba a 31 de octubre de 2013



Fdo. Dr. José Ramos Ruíz  
Catedrático de Microbiología





**TÍTULO DE LA TESIS:** Homeostasis de cationes en *Saccharomyces cerevisiae*:  
Distribución subcelular de potasio y sodio y función de Trk en la adaptación a cambios  
en el potasio externo.

**DOCTORANDO/A:** Rito Humberto Herrera Vega

**INFORME RAZONADO DEL/DE LOS DIRECTOR/ES DE LA TESIS**

(se hará mención a la evolución y desarrollo de la tesis, así como a trabajos y publicaciones derivados de la misma).

Esta Tesis aborda dos aspectos fundamentales de la homeostasis de potasio en *Saccharomyces cerevisiae*. El primero de ellos, obviado durante años, es la distribución intracelular de potasio y sodio en levaduras. El otro estudia el posible papel del principal transportador de potasio de la membrana plasmática (Trk1) en la respuesta adaptativa a cambios en los niveles externos del catión.

Los dos aspectos mencionados se han resuelto de manera muy satisfactoria durante el periodo de realización del trabajo. En el contexto de esta Tesis se han publicado cuatro trabajos en revistas internacionales de investigación. Dos de estas publicaciones son fruto directo de los objetivos mencionados (Herrera *et al.*, 2013 *Biochemical Journal* y Herrera *et al.*, 2013 *Biochimica Biophysica Acta*) y otras dos son consecuencias de colaboraciones con otros grupos (Kahm *et al.*, 2012 *PLOS Computational Biology*; Barreto *et al.*, 2011 *Eukaryotic Cell*).

Por todo ello, se autoriza la presentación de la tesis doctoral.

Córdoba, 31 de octubre de 2013

Firma del/de los director/es

Fdo.: José Ramos Ruiz Fdo.: \_\_\_\_\_





## **Agradecimientos**

En primer lugar agradecer a Dios por permitirme haber llegado a culminar esta etapa y darme fortaleza y salud durante estos años.

Deseo agradecer al Prof. José Ramos Ruíz por haberme aceptado en su laboratorio y tener la oportunidad de desarrollar este trabajo, por su paciencia, consejos y decidido apoyo en este difícil camino de la formación, muchísimas gracias Maestro.

Mi agradecimiento a mi país Panamá, por todo su apoyo durante estos años, espero poder devolverle con creces la confianza depositada en mí.

Quiero destacar el apoyo de los Drs. Fernando Calahorro Núñez y Sebastián Demyda Peirás, por su decidido apoyo en el apartado de distribución subcelular de cationes. Así como al Dr. Víctor Luque Almagro por facilitarme el uso de las ultracentrífugas y también al Prof. José M. Villalba y Prof. Isabel Burón por sus valiosos consejos en las pruebas de actividad enzimática.

A los buenos amigos y compañeros como Antonio, José Alberto, Juan Luis, Loida, Eric, Menat, Luz Marina, Cristina. A mis compañeros de laboratorio Noelia, Maricarmen, Samuel, Ulises. A Teresa Medina siempre por su diligencia y decidido apoyo en el laboratorio.

Finalmente a mis padres y hermano, que aunque en la distancia siempre han estado conmigo, por todo su sacrificio y su apoyo en mi vida, a ellos mi eterno cariño. A mi tía Mabel.

Finalmente a Gesabel, gracias por estar a mi lado estos años, sin tu apoyo no hubiera llegado hasta aquí, por ser la única que me acompañó en la oscuridad y en la luz, Dios te bendiga siempre.



## Índice General

<b>RESUMEN</b> .....	1
<b>INTRODUCCIÓN GENERAL</b> .....	5
1. Aspectos generales de la homeostasis de cationes metálicos alcalinos en la fisiología celular...	5
2. Transporte de potasio y sodio a través de la membrana plasmática.....	10
2.1. Sistemas de entrada de cationes.....	10
2.1.1. Transportador Trk1.....	11
2.1.2. Transportador Trk2.....	12
2.1.3. Transporte de alta y baja afinidad-Mecanismos de transporte de potasio.....	14
2.1.4. Regulación de Trk1 y Trk2.....	16
2.2. Sistemas de salida de cationes.....	20
3. Transporte de cationes a nivel intracelular.....	27
3.1. Transporte de cationes a través de la membrana mitocondrial interna.....	27
3.2. Transporte vacuolar.....	28
3.3. Transporte en aparato de Golgi y endosomas .....	29
3.3.1. Transportador Kha1.....	29
3.3.2. Antiportador Nhx1.....	29
4. Distribución intracelular de cationes.....	30
<b>OBJETIVOS</b> .....	33
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	35
1. Material Biológico.....	35
2. Reactivos y enzimas.....	35
3. Medios de cultivo y condiciones de crecimiento.....	36
3.1. Crecimiento en medio sólido.....	36
3.2. Crecimiento en medio líquido.....	37
4. Aislamiento de organelos.....	37
4.1. Aislamiento de vacuolas.....	37
4.2. Aislamiento de núcleos.....	40
4.3. Aislamiento de mitocondrias.....	43
4.4. Aislamiento de retículo endoplasmático.....	44
4.5. Aislamiento de aparato de Golgi.....	47
4.6. Aislamiento de la fracción citosólica.....	48
5. Controles de contaminación cruzada.....	50
6. Determinación de la concentración de proteínas.....	50
7. Permeabilización de la membrana plasmática con citocromo C.....	50
8. Análisis de contenido interno de potasio y sodio.....	52
9. Determinación de los flujos de potasio.....	52
10. Determinación del volumen celular.....	52
11. Microscopía de Fluorescencia.....	53
12. Diseño experimental y estadístico.....	53
13. Procedimientos informáticos y bases de datos.....	53
<b>RESULTADOS</b> .....	55
<b>CAPÍTULO I</b>	
1. Distribución intracelular de cationes.....	55
1.1. Eficiencia del procedimiento de aislamiento de organelos.....	55
1.2. Distribución intracelular de potasio.....	57

1.3. Distribución intracelular de cationes en células sódicas.....	68
1.4. Distribución intracelular de potasio en la cepa silvestre y en el mutante <i>trk1-2</i> en distintas fases de crecimiento.....	73
<b>CAPÍTULO 2</b>	
2. Papel de la proteína Trk1 en la adaptación frente a cambios en los niveles externos de potasio.....	83
2.1. Determinación de la función del principal transportador de potasio de la membrana plasmática en la adaptación a cambios en las concentraciones externas de potasio.....	83
2.2. Efecto de <i>NcHAK1</i> .....	93
<b>DISCUSIÓN</b> .....	99
1. Distribución intracelular de potasio y sodio en <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	99
2. Papel de la proteína Trk1 en la adaptación frente a cambios en los niveles externos de potasio.....	105
<b>CONCLUSIONES</b> .....	109
<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	111
<b>ANEXOS</b> .....	125

## Índice de Figuras

Figura 1. Estabilización del estado conformacional de una proteína mediante un catión M <sup>+</sup> .....	6
Figura 2. Transportadores de cationes importantes en la homeostasis de potasio a nivel de la membrana plasmática e intracelular en la levadura <i>S. cerevisiae</i> .....	8
Figura 3. Diagrama de barra y cadena de la proteína ScTRK1.....	11
Figura 4. Secuencia de residuos de aminoácidos de Md1 y Md2 en SpTrk1, ScTrk1 y ScTrk2.....	13
Figura 5. Mecanismo propuesto de homeostasis de potasio.....	19
Figura 6. Esquema del método de aislamiento de vacuolas.....	39
Figura 7. Esquema del método de aislamiento de núcleos.....	42
Figura 8. Esquema del método de aislamiento de mitocondrias.....	44
Figura 9. Esquema del método de aislamiento de retículo endoplasmático.....	46
Figura 10. Esquema del método de aislamiento de aparato de Golgi.....	48
Figura 11. Esquema del método de aislamiento de fracción citosólica.....	49
Figura 12. Esquema del método de extracción diferencial de iones de potasio y sodio de la vacuola y citoplasma.....	51
Figura 13. Flujograma general para la determinación de la distribución intracelular de cationes.....	55
Figura 14. La cepa silvestre (wt) y mutantes vacuolares observados mediante microscopía de fluorescencia cultivados en 50 mM de KCl.....	58
Figura 15. Ensayos de crecimiento en medio YPD.....	59
Figura 16. Tinción de esferoplastos con DAPI.....	61
Figura 17. Tinción de Núcleos con DAPI.....	61
Figura 18. Distribución intracelular de potasio en condiciones no limitantes del catión.....	62
Figura 19. Distribución intracelular de potasio en células ayunadas.....	63
Figura 20. Gráfica radar que representa la distribución intracelular de potasio en condiciones no limitantes y de ayuno del catión en la cepa silvestre.....	64
Figura 21. Gráfica radar que representa la distribución intracelular de potasio en condiciones no limitantes y de ayuno del catión en los mutantes que presentan una morfología vacuolar alterada A ( $\Delta ptc1$ ) y B ( $\Delta vam6$ ).....	65
Figura 22. Gráfica radar que representa la distribución intracelular de potasio en condiciones no limitantes y de ayuno del catión en los mutantes que carecían de un transportador vacuola de cationes A ( $\Delta vnx1$ ) y B ( $\Delta nhx1$ ).....	66
Figura 23. Distribución intracelular de potasio en condiciones no limitantes y limitantes del catión en la cepa silvestre.....	67
Figura 24. Ensayos de crecimiento en medio líquido.....	68
Figura 25. Distribución intracelular de potasio (A) y sodio (B) en células cultivadas en 0,8 M NaCl.....	70
Figura 26. Distribución intracelular de potasio y sodio en la cepa silvestre.....	71
Figura 27. Gráfica radar que compara la distribución intracelular de sodio entre las cepa silvestre y mutantes con morfología vacuolar alterada ( $\Delta ptc1$ y $\Delta vam6$ ) (A) y con los mutantes que carecían de un transportador vacuolar de cationes ( $\Delta vnx1$ y $\Delta nhx1$ ) (B).....	72
Figura 28. Contenido total de potasio de la cepa silvestre y el doble mutante <i>trk1,2</i> en 50 mM-5 mM de KCl en fase logarítmica y estacionaria.....	74

Figura 29. Distribución intracelular de potasio de la cepa silvestre y el doble mutante <i>trk1,2</i> en 50 mM KCl en fase logarítmica (A y B) y estacionaria (C y D), presentada en porcentaje (A y C) y en nmoles.mg de célula (B y D).....	75
Figura 30. Distribución intracelular de potasio de la cepa silvestre y el doble mutante <i>trk1,2</i> en 5 mM KCl en fase logarítmica (A y B) y estacionaria (C y D), presentada en porcentaje (A y C) y en nmoles.mg de célula (B y D).....	76
Figura 31. Contenido vacuolar de potasio en células ayunadas y de sodio en células sódicas en la cepa silvestre y el doble mutante <i>trk1-2</i> .....	77
Figura 32. Determinación del contenido intracelular de potasio total en 50 mM de KCl, en ayuno de potasio y luego de la adición de 10 mM de KCl en la cepa silvestre, el doble mutante <i>trk1-2</i> y el mutante del transportador de la vacuola <i>nhx1</i> .....	78
Figura 33. Determinación de la capacidad de transporte vacuolar luego del ayuno en la cepa silvestre, el doble mutante <i>trk1-2</i> y el mutante del transportador de la vacuola <i>nhx1</i> .....	79
Figura 34. Levaduras y sus respectivas vacuolas observadas mediante microscopía de fluorescencia en la cepa silvestre y el doble mutante <i>trk1-2</i> .....	80
Figura 35. Tamaño celular y vacuolar en la cepa silvestre y el doble mutante <i>trk1,2</i> .....	81
Figura 36. Crecimiento en concentración baja y alta de potasio en la cepa silvestre (W303.1A) y el doble mutante (WΔ6).....	83
Figura 37. Evolución del contenido de potasio en función de la concentración externa en la cepa silvestre.....	84
Figura 38. Evolución del contenido de potasio en función de la concentración externa en el doble mutante <i>trk 1,2</i> .....	84
Figura 39. Cambios en el crecimiento (D.O) en la cepa silvestre.....	85
Figura 40. Cambios en el crecimiento (D.O) en el doble mutante <i>trk 1,2</i> .....	85
Figura 41. Concentración interna de potasio en la cepa silvestre (W303.1A) y el doble mutante WΔ6.....	86
Figura 42. Crecimiento en concentración baja y alta de potasio de las distintas cepas de <i>TRK1</i> ...	88
Figura 43. Evolución del contenido de potasio en función de la concentración externa en el doble mutante WΔ6 transformado con <i>ScTRK1</i> .....	89
Figura 44. Evolución del contenido de potasio en función de la concentración externa en el doble mutante WΔ6 transformado con K1147N.....	89
Figura 45. Evolución del contenido de potasio en función de la concentración externa en el doble mutante WΔ6 transformado con M1153R.....	90
Figura 46. Cambios en el crecimiento (D.O) en el doble mutante WΔ6 transformado con <i>ScTRK1</i> .....	90
Figura 47. Cambios en el crecimiento (D.O) en el doble mutante WΔ6 transformado con K1147N.....	91
Figura 48. Cambios en el crecimiento (D.O) en el doble mutante WΔ6 transformado con M1153R.....	91
Figura 49. Concentración interna de potasio en cepas con la versión <i>ScTRK1</i> , K1147N y M1153R.....	93
Figura 50. Evolución del contenido de potasio en función de la concentración externa en el doble mutante <i>trk 1,2</i> transformado con una versión del transportador NcHAK1 de <i>Neurospora crassa</i> .....	94
Figura 51. Evolución del contenido de potasio en función de la concentración externa en el doble mutante <i>trk 1,2</i> transformado con una versión del plásmido vacío pYGE15.....	94

Figura 52. Cambios en el crecimiento (D.O) en el doble mutante <i>trk 1,2</i> transformado con una versión del transportador NcHAK1 de <i>Neurospora crassa</i> .....	95
Figura 53. Cambios en el crecimiento (D.O) en el doble mutante <i>trk 1,2</i> transformado con una versión del plásmido vacío pFL15.....	96
Figura 54. Concentración interna de potasio en el doble mutante WΔ6 y WΔ6 transformado con una versión del transportador NcHAK1 de <i>Neurospora crassa</i> .....	96
Figura 55. Modelo para el flujo y distribución intracelular de potasio en condiciones no limitantes y de ayuno del catión para la cepa silvestre en <i>S. cerevisiae</i> .....	102





## Índice de Tablas

Tabla 1. Levaduras estudiadas en este trabajo.....	35
Tabla 2. Medios de cultivos utilizados en levaduras.....	36
Tabla 3. Porcentajes de eficiencia de aislamiento de organelos.....	56
Tabla 4. Cepas utilizadas para el estudio de la distribución intracelular de cationes.....	58
Tabla 5. Contenido total de potasio en condiciones no limitantes y de ayuno de potasio.....	60
Tabla 6. Contenido total de potasio y sodio en células cultivadas en sodio.....	69
Tabla 7. Distribución intracelular de potasio de la cepa silvestre y el doble mutante <i>trk1,2</i> en 50 mM y 5 mM de KCl en fase logarítmica y estacionaria (nmoles/mg de célula).....	77



## RESUMEN

Las células acumulan potasio para múltiples funciones. Ha sido bien documentado que la levadura modelo *Saccharomyces cerevisiae* crece a diferentes concentraciones externas de cationes alcalinos y mantiene altas y bajas concentraciones intracelulares de potasio y sodio, respectivamente. Sin embargo, se ha prestado poca atención al estudio de la distribución intracelular de estos cationes. La aproximación experimental más ampliamente utilizada, la permeabilización de la membrana plasmática, produce resultados incompletos, ya que usualmente sólo considera el citoplasma y las vacuolas como compartimentos donde los cationes están presentes en cantidades significativas. Mediante el aislamiento y análisis de los principales organelos de esta levadura, se ha determinado la localización subcelular de potasio y sodio en *S. cerevisiae*. Se ha observado que mientras las vacuolas acumulan la mayoría del potasio y sodio intracelular, el citosol contiene cantidades relativamente bajas de estos cationes, lo cual es especialmente relevante en el caso del sodio. Sin embargo, las concentraciones de potasio en el citosol, son mantenidas bastante constantes durante el proceso de ayuno de potasio, concluyéndose que para este propósito el potasio vacuolar es rápidamente movilizado. También se observó que la distribución intracelular está alterada en cuatro mutantes diferentes con una fisiología vacuolar defectuosa. Tanto en la cepa silvestre como en los mutantes vacuolares, el núcleo contiene y mantiene un porcentaje relativamente constante e importante de potasio y sodio, los cuales están muy probablemente involucrados en la neutralización de cargas negativas.

El contenido intracelular de potasio de un mutante carente del principal sistema de transporte de la membrana plasmática (*trk1,2*) fue menor que el de la cepa silvestre cuando creció en condiciones limitantes del catión (5 mM KCl). Por el contrario, durante la fase estacionaria, el contenido intracelular del catión fue mayor en el mutante. Esto se vio reflejado en el potasio de los organelos, el doble mutante cultivado en 5 mM de KCl acumuló menos potasio en la vacuola, núcleo y "citoplasma" en fase logarítmica, mientras que en fase estacionaria retuvo más potasio en los mismos que la cepa silvestre.

*S. cerevisiae* es capaz de adaptar sus niveles intracelulares de potasio a cambios en el medio externo. La homeostasis de potasio en la cepa silvestre, resuspendida en un medio con bajo potasio es un ejemplo de adaptación imperfecta, ya que la concentración

intracelular depende de los niveles extracelulares del catión. Utilizando levaduras que carecen o expresan diferentes versiones mutadas del principal sistema de transporte de potasio de la membrana plasmática (Trk), se observó que Trk1 no es esencial para la adaptación a los cambios de potasio, sin embargo la dinámica de la pérdida de potasio fue cuantitativamente muy diferente entre la cepa silvestre y el doble mutante *trk1,2* o en las levaduras que expresan versiones de Trk1 con características de transporte altamente defectuosas. Finalmente, se observó que el comportamiento descrito en este trabajo puede también ser llevado a cabo mediante la expresión heteróloga de *NcHAK1*, el transportador de potasio de alta afinidad de *Neurospora crassa*, que no pertenece a la familia TRK.

## SUMMARY

Living cells accumulate potassium to fulfil multiple functions. It is well documented that the model yeast *Saccharomyces cerevisiae* grows at very different concentrations of external alkali cations and keeps high and low intracellular concentrations of potassium and sodium respectively. However less attention has been paid to the study of the intracellular distribution of these cations. The most widely used experimental approach, plasma membrane permeabilization, produces incomplete results, since it usually considers only cytoplasm and vacuoles as compartments where the cations are present in significant amounts. By isolating and analysing the main yeast organelles, we have determined the subcellular location of potassium and sodium, the cytosol contains relatively low amounts, which is especially relevant in the case of sodium. However,  $K^+$  concentrations in the cytosol are kept rather constant during the  $K^+$ -starvation process and we concluded that, for that purpose, vacuolar  $K^+$  has to be rapidly mobilized. We also show that this intracellular distribution is altered in four different mutants with impaired vacuolar physiology. Finally, we show that both in wild-type and vacuolar mutants, nuclei contain and keep a relatively constant and important percentage of total intracellular  $K^+$  and  $Na^+$ , which most probably is involved in the neutralization of negative charges.

Yeast mutants lacking the main plasma membrane potassium transporter contained less potassium than the wild type when grown at limiting potassium (5 mM KCl). However, during stationary phase, the intracellular content was higher in the mutant. This fact was also observed in the main organelles. The double mutant contained less potassium in the vacuole, the nucleus and "cytoplasm" during log phase, while in the stationary phase, the same organelles retained more potassium than the control strain.

*S. cerevisiae* cells are able to grow at very different potassium concentrations adapting its intracellular cation levels to changes in the external milieu. Potassium homeostasis in wild type cells resuspended in media with low potassium is an example of non-perfect adaptation since the same intracellular concentration is not approached irrespective of the extracellular levels of the cation. By using yeasts lacking the Trk1,2 system or expressing different versions of the mutated main plasma membrane potassium

transporter (Trk1), we show that Trk1 is not essential for adaptation to potassium changes but the dynamics of potassium loss is very different in the wild type and in *trk1,2* mutant or in yeasts expressing Trk1 versions with highly impaired transport characteristics. We also show that the pattern here described can also fulfilled by heterologous expression of *NcHAK1*, a potassium transporter not belonging to the TRK family.

## Introducción

### **1. Aspectos generales de la homeostasis de cationes metálicos alcalinos en la fisiología celular.**

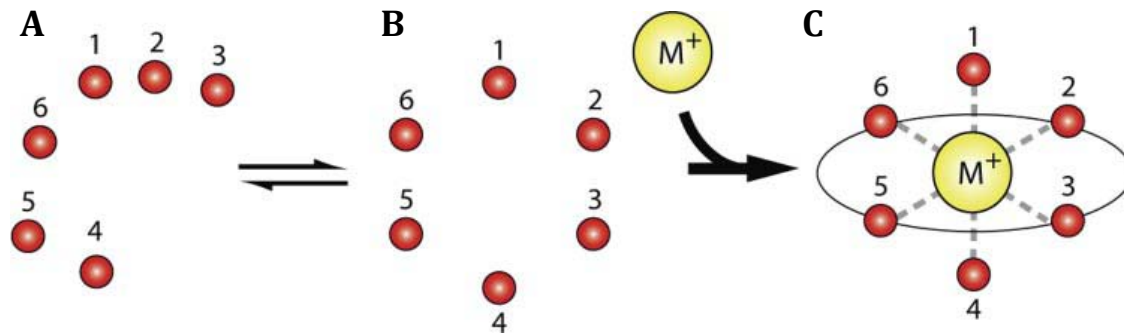
La relevancia de los metales alcalinos en la fisiología celular, incluyendo fundamentalmente su entrada y salida de la célula, ha sido de gran interés científico en los últimos 100 años. Se hizo evidente muy pronto, que mientras el potasio es acumulado en altas cantidades en diferentes tipos de células y es indispensable para muchas funciones fisiológicas, el sodio por otra parte es tóxico y en altas concentraciones es letal. Entre otros tipos de células, las levaduras se han desarrollado como un modelo ideal para el estudio de la homeostasis y el transporte de cationes metálicos alcalinos desde hace 50 años (Ariño *et al.*, 2010).

Las razones para la utilización de *Saccharomyces cerevisiae* como organismo modelo para el estudio de la homeostasis de cationes metálicos alcalinos en células eucariotas, se fundamentan en que su secuencia genómica está completamente anotada (el primero entre todos los eucariotas) (Goffeau *et al.*, 1996), existe una amplia comprensión *in silico* de todos los transportadores (Nelissen *et al.*, 1997), además de su rápido crecimiento y la disposición de herramientas genéticas para preparar mutantes. Posteriormente, un análisis comparativo de las secuencias genómicas entre diferentes especies de levaduras, demostró que aproximadamente un 10% del genoma de una levadura Hemiascomicete corresponde a transportadores de membrana y un análisis detallado de los genes que codifican para estos transportadores, reveló que los sistemas que garantizan una salida y entrada eficiente de potasio y/o sodio han sido altamente conservados (De Hertogh *et al.*, 2006).

Aunque muchas levaduras no encuentran normalmente altas concentraciones de sodio en su habiudad natural, estas pueden encontrarse habitualmente con situaciones en que estén presentes mayores concentraciones de sodio en el ambiente, que el potasio que las levaduras requieren. En estas circunstancias, las células gastan una gran cantidad de energía acumulando suficientes cantidades de potasio a nivel intracelular y manteniendo una baja concentración de sodio a nivel citosólico. El potasio es requerido para muchas funciones fisiológicas, como la regulación del volumen y pH intracelular, el mantenimiento de un potencial estable a través de la membrana plasmática, compensación de cargas negativas en muchas macromoléculas, síntesis de proteínas, altos niveles de potasio son



requeridos para la replicación y traducción, (Fell *et al.*, 2011) y activación enzimática (Figura 1) (Page y Di Cera, 2006; Ariño *et al.*, 2010).

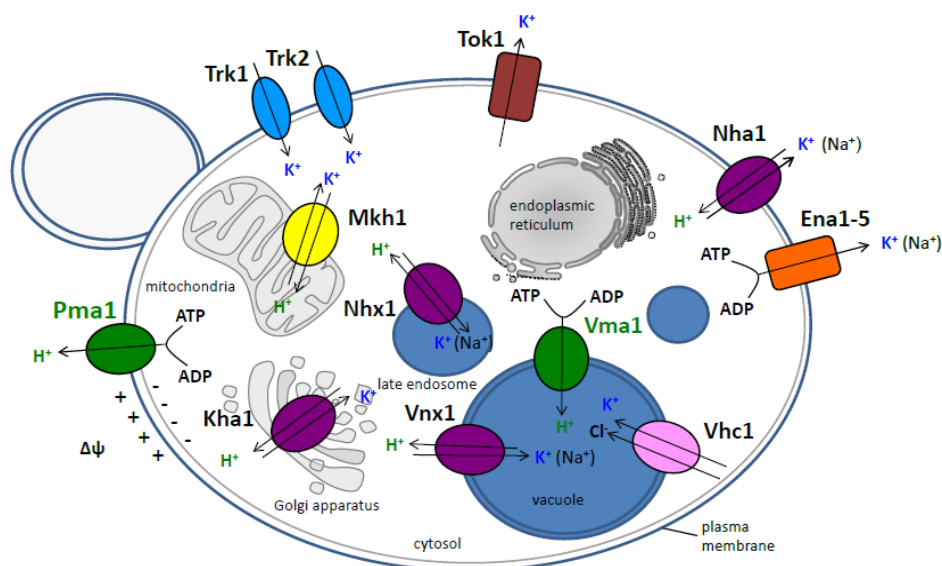


**Figura 1. Estabilización del estado conformacional de una proteína mediante un catión  $M^+$ .** La unión al catión puede alterar la cantidad de proteínas con un estado que mejore sus propiedades enzimáticas. Además, el catión puede proveer estabilidad en condiciones de alta salinidad y/o temperatura (Adaptado de Page y Di Cera, 2006).

Sin embargo, *S. cerevisiae* es capaz de crecer en un amplio rango de concentraciones externas de potasio (10  $\mu$ M a 2,5 M) y de sodio (<1,5 M) y algunas especies de levaduras no convencionales pueden crecer en soluciones salinas casi saturadas (Ariño *et al.*, 2010). A pesar de un amplio conocimiento acerca de la identidad y función de la mayoría de los transportadores de potasio en este organismo, a nivel de sistema se desconoce el papel y la regulación de varias rutas de transporte (Kahm *et al.*, 2012). Para mantener una óptima concentración de iones de potasio y un estable y la vez alto ratio de potasio/sodio, las levaduras emplean tres diferentes estrategias: (1) una estricta discriminación entre cationes metálicos alcalinos a nivel de su entrada (los transportadores presentan una mayor afinidad por el potasio que por el sodio), (2) eficiente salida de la célula de aquellos cationes tóxicos o que están en exceso y (3) acumulación selectiva (compartimentalización) de cationes en organelos celulares. En las levaduras los sistemas de transporte existen tanto a nivel de la membrana plasmática como en las membranas de los organelos, los cuales median los flujos de cationes con distintas especificidades de sustrato y utilizando diversos mecanismos (Ariño *et al.*, 2010). Por ejemplo, la  $H^+$ -ATPasa de la membrana plasmática codificada por el gen *PMA1* juega un papel importante en la homeostasis de iones (Morsomme *et al.*, 2000). También están presentes los simportes y antiportes activos secundarios, además de canales pasivos. La distribución asimétrica de potasio a través de la membrana plasmática ha sido una constante durante la evolución de muchos organismos (Navarrete *et al.*, 2010).

Entre las funciones principales de los transportadores de la membrana plasmática están: (1) proveer a la célula suficientes cantidades de potasio, ya que la concentración de potasio en el citoplasma es de aproximadamente 200-300 mM dependiendo de la cepa y condiciones de crecimiento (Ramos *et al.*, 1994; Haro y Rodríguez-Navarro, 2002), (2) eliminar cationes tóxicos como sodio y litio, el cual se acumula en vacuola en un 85%, (Perkins y Gadd, 1993), (3) preservar el potencial de membrana (Blatt y Slayman, 1987; Rodríguez-Navarro, 2000) (4) mantener la homeostasis de potasio, (5) regular el pH intracelular, (6) mantener un turgor positivo dentro de la célula, lo cual es necesario para la expansión de la pared celular, la membrana plasmática y la división celular (7) hacer frente al estrés osmótico (Ariño *et al.*, 2010).

Existen seis diferentes transportadores de cationes metálicos alcalinos en la membrana plasmática: los sistemas de entrada de potasio Trk1 y Trk2, el simporte  $P_i$ - $Na^+$  Pho 89, el canal de potasio Tok1 y los sistemas de salida de potasio  $Na^+$ -ATPasa y el antiporte Nha1  $Na^+/H^+$  (Ariño *et al.*, 2010). Además, existe un canal que ha sido experimentalmente probado por medio de la técnica de patch-clamping (parches de membranas) en protoplastos de *S. cerevisiae* y que recibe el nombre de NSC (Non-Selective cation/anion Channels) (Bihler *et al.*, 1998). Los genes *TRK1* y *TRK2* codifican para sistemas de captación de potasio parcialmente redundantes (uniporte), que son capaces de acumular eficientemente los cationes de potasio necesarios (Rodríguez-Navarro, 2000). Trk1 es el transportador prominente de potasio (Figura 2) y aunque Trk2 es menos efectivo, su actividad contribuye significativamente al aporte de potasio y el mantenimiento del potencial de membrana (Petrezsélyová *et al.*, 2011). Recientemente se ha reportado, un nuevo par de sistemas de baja afinidad para la entrada de potasio llamados Kch1 y Kch2, que están involucrados en la señalización de calcio, los cuales han sido parcialmente caracterizados y que podrían estar relacionados con NSC (Stefan *et al.*, 2013).



**Figura 2. Transportadores de cationes importantes en la homeostasis de potasio a nivel de la membrana plasmática e intracelular en la levadura *S. cerevisiae*** (Adaptado de Ariño *et al.*, 2013).

Existen tres sistemas que median la salida de cationes en *S. cerevisiae*. Tok1 es un canal específico de expulsión de potasio (Ketchum *et al.*, 1995; Bertl *et al.*, 1998) cuya actividad contribuye significativamente al mantenimiento del potencial de la membrana plasmática (Maresova *et al.*, 2006). Los otros dos sistemas de expulsión tanto de cationes tóxicos ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{Li}^+$ ,  $\text{Rb}^+$ ) como de exceso de potasio en las células tienen una función dual, la desintoxicación y mantenimiento de la homeostasis de cationes y pH. Nha1 es un antiportador que utiliza la entrada de un gradiente de protones creada por la ATPasa Pma1 para activar el bombeo de protones hacia el exterior de la célula (Kinclova *et al.*, 2001) y los genes *ENA*, usualmente en varias copias en el genoma de *S. cerevisiae*, (Garcia-deblas *et al.*, 1993; Wieland *et al.*, 1995), los que codifican para una ATPasa de bombeo de cationes hacia el exterior de la célula, principalmente a pH alto (Ruíz y Ariño, 2007). Los transportadores de membrana colaboran estrechamente de una manera coordinada, lo que se traduce en una eficiente y continua entrada y salida de cationes de potasio en las levaduras (Navarrete *et al.*, 2010; Zahrádka y Sychrová, 2012).

Los transportadores a nivel intracelular comprenden principalmente antiportadores tipo catión/ $\text{H}^+$  en vacuolas como Vnx1 y Vhc1 (un simporte que transporta cloro con sodio y/o potasio, que pertenece a la familia de transportadores CCC, cotransportador cloro-catión), (Petrezsélyová *et al.*, 2013), en los endosomas (Nhx1) y en las membranas del aparato de Golgi (Kha1). Los sistemas de transporte de cationes a nivel

de organelos realizan las siguientes funciones: (1) regulan la homeostasis de cationes citosólica (desintoxicación de sodio debido a su acumulación en la vacuola), (2) mantenimiento y regulación del pH y de la homeostasis de potasio en los organelos, (3) modulación del tráfico de proteínas a través del endosoma y/o vías secretoras (Ariño *et al.*, 2010).

El alto contenido de potasio en las levaduras corresponde a un estado de equilibrio entre la entrada y salida simultánea del catión a través de la membrana plasmática, y una continua circulación, la cual se cree es necesaria para las funciones fisiológicas básicas (Ortega y Rodríguez-Navarro, 1985; Lapathitis y Kotyk, 1998). La coordinación entre los sistemas de entrada y salida de potasio es necesaria para el mantenimiento del potencial a través de la membrana plasmática. La ausencia de sistemas de entrada de potasio provoca la hiperpolarización de la membrana plasmática (Madrid *et al.*, 1998) y la delección de los sistemas de salida de potasio provoca la despolarización de la membrana plasmática (Kinclova-Zimmermannova *et al.*, 2004).

En la presencia de concentraciones de sodio relativamente bajas, la entrada de potasio por medio de transportadores eficientes supera la entrada de sodio. En células ayunadas, aunque la concentración externa de sodio sea 100 veces más alta que la de potasio, la concentración intracelular de sodio permanece relativamente baja.

La concentración intracelular de potasio en *S. cerevisiae*, bajo condiciones *normales* (cultivo en medios con cantidades controladas de potasio y sodio) alcanza entre 200 a 300 mM (dependiendo de la cepa y el medio) y disminuye con la entrada de sodio. Tan pronto como la concentración intracelular de sodio supera a la de potasio, el crecimiento celular es parcialmente inhibido, y al incrementarse la concentración de sodio, la célula muere. En términos generales, el efecto del sodio combina dos componentes: la toxicidad del sodio que inhibe muchas funciones enzimáticas y un estrés osmótico considerable causado por las altas concentraciones externas de sales de sodio. Las dianas celulares para la toxicidad del sodio o el litio no están bien definidas todavía (Murguía *et al.*, 1996; Dichtl *et al.*, 1997; Masuda *et al.*, 2001). Sin embargo, recientemente la proteína quinasa halotolerante Hal5p, un regulador del transporte de potasio de Trk1p, ha demostrado ser el supresor de casi un tercio de las mutaciones de genes sensibles a litio involucrados en la esporulación y meiosis, así como en la biosíntesis de ergosterol (Zhao *et al.*, 2010).

Para la supervivencia bajo altas concentraciones externas de sodio, la célula debe reaccionar ante la pérdida de agua provocada por el choque osmótico, así como un desfavorable ratio intracelular de potasio/sodio. Además de los transportadores de la membrana plasmática, los transportadores intracelulares, principalmente Vnx1 y Nhx1 (antiportadores), juegan un papel importante en la disminución de las concentraciones citosólicas de sodio, pues estos ayudan a secuestrar el sodio en la vacuola. El transporte y almacenamiento de cationes metálicos alcalinos no sólo sirve para mantener concentraciones óptimas de potasio a nivel citosólico o para disminuir la cantidad de sodio tóxico en el citosol, sino que también ayuda a compensar la cargas negativas de los polifosfatos en la vacuola (Klionsky *et al.*, 1990).

## **2. Transporte de potasio y sodio a través de la membrana plasmática.**

### **2.1. Sistemas de entrada de cationes**

La identificación y caracterización de los genes que codifican los dos principales transportadores involucrados en la entrada de potasio en *S. cerevisiae* *TRK1* y *TRK2* fue reportada por Gaber y otros (Gaber *et al.*, 1988; Ko *et al.*, 1990; Ko y Gaber 1991).

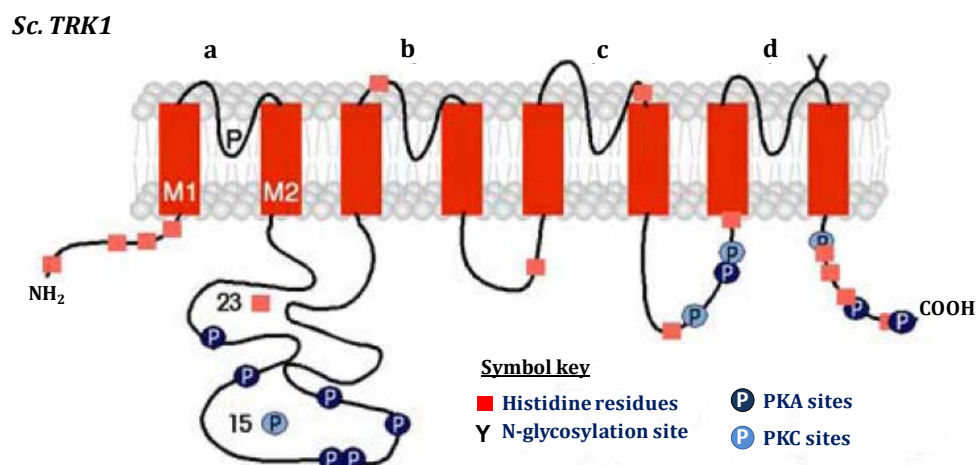
En cuanto a la entrada de sodio a la célula, se propuso la existencia de un transportador de cationes metálicos alcalinos, idea que se reforzó cuando se propuso que el sodio se une al sitio de activación del transportador de potasio, lo cual afecta el transporte de rubidio y potasio (Borst-Pauwels, 1981). Sin embargo, no parece estar clara la existencia de un transportador específico de sodio en *S. cerevisiae*, y se sugiere que este catión probablemente entra a la célula de manera significativa si su concentración externa es alta. El sodio inhibe competitivamente la entrada de potasio en la cepa silvestre, y además se sabe que Trk1 debe aceptar y transportar sodio junto al potasio, aunque con mucha menos afinidad (Ramos *et al.*, 1985). El doble mutante *trk1 trk2* acumula más sodio y menos potasio que la cepa silvestre, sugiriendo que los transportadores no específicos y de baja afinidad actúan en estas células, pero no discriminan entre potasio y sodio (Gómez *et al.*, 1996). En este sentido el canal NSC1 en ausencia de calcio, transporta sodio o litio (Bihler *et al.*, 1998).

En 1977 se propuso que la captación de fosfato en *S. cerevisiae* estaba mediada por dos mecanismos, siendo uno de ellos dependiente de sodio (Roomans *et al.*, 1977). También se observó que el mecanismo involucrado en los dos sitios con afinidad por sodio y litio, pero no por el rubidio, también estimula la captación de fosfato. Se encontró que los

genes *PHO84* y *PHO89* codificaban para dos cotransportadores de fosfato de alta afinidad localizados en la membrana plasmática. Mientras Pho84 cataliza el transporte de fosfato acoplado a protones a pH ácido, Pho89 cataliza la captación de fosfato dependiente de sodio a pH alcalino (Persson *et al.*, 1998). Recientemente, se ha reportado que proteoliposomas conteniendo Pho89, purificado y reconstituido, muestran una actividad de transporte de fosfato dependiente de sodio, impulsada por un gradiente electroquímico de sodio, lo cual implica que Pho89 opera como un simporte, además su actividad es sensible al ionóforo monensina (Sengottaiyan *et al.*, 2012).

### 2.1.1. Transportador Trk1

*TRK1* fue el primer gen aislado y estudiado el cual codificaba para un transportador de potasio (Figura 3) en células eucariotas no animales. *TRK1* codifica para una proteína de la membrana plasmática de 180 kilodalton, de 1235 residuos de aminoácidos y doce dominios de membrana (Gaber *et al.*, 1988). Un análisis de la secuencia de residuos de aminoácidos entre Trk1 y los dominios de unión de nucleótidos de un número de proteínas procariotas y eucariotas indicó similitudes significativas y además, ortólogos de *TRK1* fueron identificados en levaduras, plantas y hongos filamentosos (Rodríguez-Navarro, 2000). Trk1 es una proteína integral de la membrana plasmática asociada a los dominios “raft” (combinación de glicoesfingolípidos y receptores de proteínas organizadas en microdominios de glicoproteínas) (Yenush *et al.*, 2005).



**Figura 3. Diagrama de barra y cadena de la proteína ScTRK1.** La subunidad de plegado primaria está compuesta por un par de hélices transmembranales (M1, M2), en medio de un lazo recurrente (P), con una secuencia altamente conservada entre las cuatro unidades MPM (a-d) y con similitudes significativas a los canales de potasio bacterianos. (Adaptado de Rivetta *et al.*, 2005).

Para *S. cerevisiae* *TRK1* no es esencial para su supervivencia. Células haploides que contienen un alelo nulo de *TRK1* (*trk1Δ*), presentaban una característica particular, la disminución de la eficiencia en el transporte de potasio hacia el interior de la célula (Rodríguez-Navarro y Ramos, 1984; Ramos *et al.*, 1985; Gaber *et al.*, 1988). La cepa silvestre de *S. cerevisiae* es capaz de crecer a concentraciones micromolares muy bajas y exhibe un transporte con alta velocidad y alta afinidad por el potasio y rubidio ( $V_{\max}$  de 30 nmoles/mg de célula/minuto y  $K_m$  de 0,024 y 0,08 mM, respectivamente) (Rodríguez-Navarro y Ramos, 1984), mientras que los mutantes *trk1* muestran un incremento en sus requerimientos y transporte (rubidio) de potasio (Ramos *et al.* 1985; Gaber *et al.*, 1988). Estas células no son capaces de crecer en 0,1 mM de KCl y la  $V_{\max}$  del transporte de rubidio disminuyó de 30 nmol/mg/minuto en la cepa silvestre a unos 5 nmol/mg/minuto en el mutante. Mientras que el papel de Trk1 como el principal transportador está muy bien documentado, un enfoque electrofisiológico ha revelado un papel adicional para las proteínas Trk, la salida de iones de cloro (Kuroda *et al.*, 2004). Además, la permeabilidad a los iones de cloro es una propiedad estable de las proteínas TRK y es independiente de la concentración citoplasmática de cloro. La cinética de las corrientes de cloro, que depende del voltaje de la membrana plasmática, es la misma para ambas proteínas TRK y es independiente de sus niveles de activación/expresión (Rivetta *et al.*, 2005).

La viabilidad de los mutantes *trk1* sugiere la existencia de un transportador de potasio funcionalmente independiente, cuya función debe ser irrelevante en la cepa silvestre. Además, el grupo de R. Gaber utilizó mutantes *trk* para separarlos de mutantes (llamados *Kla-*) que requerían altas concentraciones de potasio en el medio para mantener el crecimiento.

### 2.1.2. Transportador Trk2

Por otra parte, *TRK2* es el segundo gen *TRK* en *S. cerevisiae*. Este codifica para una proteína pequeña de 889 residuos de aminoácidos y es 55% idéntica a Trk1. También contiene 12 dominios transmembranales propios, dispuestos en cuatro segmentos MPM, los cuales tienen una similitud con Trk1, que contiene cuatro dominios repetitivos que se asemejan a la estructura del canal KcsA de *Streptomyces lividans*, el cual se compone de cuatro unidades idénticas (Haro y Rodríguez-Navarro, 2002), de entre un 70 a 90%. La principal diferencia entre Trk1 y Trk2 está entre el primero y el segundo de los motivos MPM, en Trk1 este lazo es de 642 residuos de aminoácidos, mientras que en Trk2 este





### **2.1.3. Transporte de alta y baja afinidad-Mecanismos de transporte de potasio.**

La relación entre los genes que codifican para los transportadores y modalidades de transporte de potasio han sido algo controvertidas (Ariño *et al.*, 2010). Se ha mencionado que antes del aislamiento de los genes *TRK*, la existencia de una modalidad dual de entrada de potasio, mostraba alta o baja afinidad por el catión (Rodríguez-Navarro y Ramos, 1984). Ya que la falta de *Trk1* producía un incremento en los requerimientos de potasio y defectos en su transporte, esta proteína fue propuesta para ser el transportador de alta afinidad de potasio y por la misma razón, el gen ortólogo *TRK2* fue considerado el que codificaba el sistema de baja afinidad. La idea fue reforzada por la modesta contribución de *Trk2* a la captación de potasio en la cepa silvestre y por la baja entrada de potasio mediada por *Trk2* en las cepas *trk1 TRK2* (Ko *et al.*, 1990; Vidal *et al.*, 1995). Sin embargo, este escenario era demasiado sencillo, ya que por una parte mostraba que *Trk2* podía ser un transportador de afinidad alta/moderada y por otra, presentaba un proceso de transporte residual de potasio, con una  $K_m$  en un rango mM comparable con los mutantes que carecían de ambos genes (Madrid *et al.*, 1998).

Es interesante resaltar la relación entre los genes *TRK* y la existencia de diferentes modalidades de transporte de potasio. En la cepa silvestre, la mayor parte de la entrada de potasio es mediada por *Trk1*, el cual puede funcionar como un transportador de alta o baja afinidad de acuerdo al crecimiento y estatus de potasio en la célula. Además, la cepa silvestre creciendo sin limitaciones de potasio, mostraría la modalidad de transporte de baja afinidad, sin embargo después de un período de ayuno de potasio, se presentaría el transporte de alta afinidad. *Trk2* podría también transportar potasio con una afinidad moderada alta, sin embargo el gen se expresa limitadamente bajo estas condiciones. Esta actividad pudiera ser enmascarada por la presencia de *TRK1*.

En cepas carente de ambos transportadores, un proceso de transporte ectópico podría actuar. Este proceso independiente de *Trk* muestra una muy baja afinidad (con una  $K_m$  en rango milimolar) y un sistema de transporte que realmente no está claramente definido, aunque algunas pistas acerca de la naturaleza de estos transportadores pudiera estar relacionada con las actividades de otros transportadores, como el canal *NSC1* o el exportador de droga *Qdr2* (Ariño *et al.*, 2010). La utilización de técnicas electrofisiológicas permitió medir las corrientes generadas por el potasio y que fueron detectadas en mutantes *trk1 trk2* y en el canal involucrado en el proceso (*NSC1*). Este canal parece un

candidato potencial la captación de potasio de muy baja afinidad en los mutantes *trk1 trk2*. Esta actividad se encuentra bloqueada por concentraciones milimolares de calcio y otros cationes bivalentes. Esta es desbloqueada al disminuir la cantidad de metales bivalentes a aproximadamente 10  $\mu\text{M}$  y es independiente de los otros transportadores de potasio identificados Tok1, Trk1 y Trk2 (Bihler *et al.*, 1998). Los análisis mediante patch-clamping de NSC1, señalan que este canal podría contrarrestar en parte la inhibición en el crecimiento impuesta por la disrupción de los transportadores de potasio Trk1 y Trk2. Luego se propuso como una ruta primaria de entrada de baja afinidad de iones de potasio en levaduras. Dentro de los factores que suprimen la actividad de NSC1 e inhiben el crecimiento del doble mutante *trk1 trk2*, se encuentran la alta concentración de calcio, pH extracelular ácido, higromicina B y en menor grado el tetraetilamonio. El crecimiento del doble mutante *trk1 trk2* es también inhibido por litio y amonio, sin embargo, estos iones no inhiben a NSC1, pero entran a la célula por medio de este canal. La inhibición del crecimiento por iones de litio es probablemente un efecto tóxico, mientras que la inhibición del crecimiento por amonio probablemente es consecuencia de inhibición competitiva, es decir, sustitución de potasio por amonio (Bihler *et al.*, 2002). Recientemente se han identificado un par de proteínas homólogas transmembranales con afinidad extracelular por potasio, Kch1 y Kch2 (Prm6), como componentes necesarios para la activación del mecanismo HACS (sistema de entrada de alta afinidad por calcio). Cuando se induce su sobreexpresión, Kch1 y Kch2, localizadas en la membrana plasmática, activan el sistema HACS, de manera que este depende del potasio extracelular. Estas proteínas también promueven el crecimiento de mutantes *trk1 trk2*, en bajas concentraciones de potasio, sugiriendo que promueven la captación de potasio por lo que aparecen como candidatas que relacionen NSC1 y el proceso de transporte ectópico en los mutantes *trk1,2* (Stefan *et al.*, 2013).

En relación a los mecanismos de transporte de potasio, este se acumula en las levaduras en contra de un amplio rango de gradientes de concentración. Mientras que las concentraciones intracelulares potasio están entre 200 a 300 mM, el potasio extracelular puede estar en un rango micromolar. Las levaduras se adaptan a cambios en las condiciones ambientales y el mecanismo de transporte puede no ser el mismo bajo diferentes condiciones de crecimiento (Ariño *et al.*, 2010).

La ATPasa de la membrana plasmática expulsa protones fuera de la célula y crea un potencial de membrana que atrae el potasio hacia el interior de la célula. Los resultados utilizando diversas sondas (-100/-125 mV) parecen subestimar el potencial real de la

membrana. De acuerdo a la ecuación de Nernst y asumiendo que el potencial de membrana está cercano a -300 mV, la existencia de un uniportador de potasio podría explicar el gradiente de potasio intracelular/potasio extracelular observado. Sin embargo, bajo ciertas condiciones como un potasio bajo en combinación con un pH externo ácido, donde las células están menos hiperpolarizadas, un uniporte no podría cubrir los requerimientos celulares y un proceso activo es probablemente requerido en *S. cerevisiae*. En este caso la ATPasa de potasio o un mecanismo podría explicar la captación activa de potasio. La posible existencia de una ATPasa de potasio ha recibido poco apoyo durante los últimos veinte años y además, sistemas similares al ACU (captación de cationes alcalinos) que son ATPasas presentes en *Ustilago maydis* o *Pichia sorbitophila* no están presentes en *S. cerevisiae* (Benito *et al.*, 2004). Por otra parte el funcionamiento de un simporte  $K^+/H^+$  ha sido apoyado por el hecho de que dos sitios de unión a cationes están presentes en el transportador de potasio de la levadura y por la existencia de un simporte en *Neurospora crassa* (Rubio *et al.*, 1995). La posibilidad de que el sistema Trk funcione como un simporte  $K^+-Na^+$  similar a los descritos en plantas no se puede descartar y el hecho de que la familia de transportadores HKT/TRK es muy específica para cationes metálicos alcalinos en plantas podría tomarse como una indicación de que un mecanismo de transporte de potasio y sodio puede operar en *S. cerevisiae* (Haro *et al.*, 2005).

#### 2.1.4. Regulación de Trk1 y Trk2.

Aunque parece que *TRK1* se expresa menos en fase estacionaria (Gasch *et al.*, 2000), no hay evidencia experimental de regulación a nivel transcripcional bajo estrés relacionado con cationes. Diversos reportes indican que *TRK2* está bajo una compleja regulación transcripcional; la expresión de *TRK2* está negativamente regulada por el complejo de histonas deacetilasa Rpd3/Sin3 y por un elemento URS1 dentro de la región promotora (Vidal *et al.*, 1995). Se ha observado, mediante análisis de Northern blot que no hay transcritos de *TRK2* en la cepa silvestre o en el mutante *trk1*, sugiriendo que en estas cepas *TRK2* no fue expresado y que la delección de *SIN3* resultó en la derepresión de la transcripción de *TRK2* (Michel *et al.*, 2006). Sin embargo, así como la expresión de *TRK1*, la expresión de *TRK2* no está alterada por perturbaciones en la homeostasis de cationes.

Se han identificado a las proteínas quinasas *HAL4/SAT4* y *HAL5* como genes capaces de conferir tolerancia a cationes tóxicos en la cepa silvestre. Las características de estos genes revelan que son activadores parcialmente redundantes del transporte de potasio y actúan modulando positivamente Trk1 y Trk2 (Mulet *et al.*, 1999). Esto dio lugar

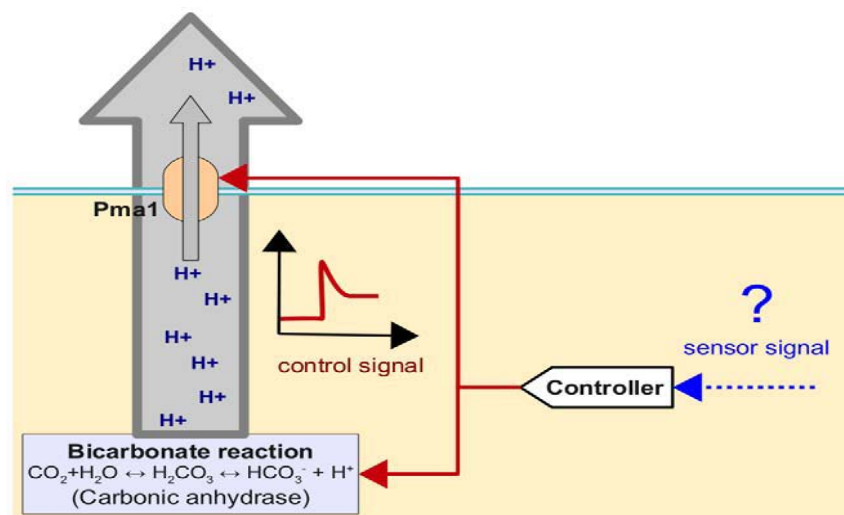
a la posibilidad de que el sistema Trk puede ser directamente controlado por eventos de fosforilación. El papel de estas quinasas no está restringido a Trk1, y varios transportadores de nutrientes como Can1, Fur4 y Hxt1, sino que se encontraron afectados en el mutante *hal4 hal5* en condiciones de bajo potasio. La caracterización de los mecanismos moleculares responsables por este modo de regulación, requiere la identificación de los sustratos de las quinasas Hal4 y Hal5 (Ariño *et al.*, 2010). Sin embargo, existen datos que sugieren que el transportador Trk1 está bajo regulación endocítica. Específicamente se ha observado, que en un mutante que carece de las proteínas quinasas Sat4/Hal4 y Hal5, Trk1, es rápidamente enviado a la vacuola en ausencia de potasio. Actualmente, los mecanismos de funcionamiento de Hal4 y Hal5 están bajo investigación (Mulet *et al.*, 2013).

La proteína quinasa SR Sky1 fue aislada de una búsqueda de clones capaces de restaurar la sensibilidad a espermina de mutantes tolerantes a la misma. Las cepas que carecían de *SKY* fueron tolerantes a niveles tóxicos de espermina, mientras la sobreexpresión de *SKY1* en la cepa silvestre incrementó su sensibilidad a esta poliamina (Erez y Kahana, 2001). Además de la tolerancia a espermina, los mutantes *sky1* fueron tolerantes a sodio y litio, sin embargo el papel de Sky1 en la tolerancia a cationes y la homeostasis de potasio no está claro. Algunos reportes, en base a análisis genéticos y medidas de entrada de rubidio, postulan que ésta quinasa modula los transportadores Trk1 y Trk2 (Forment *et al.*, 2002).

Además el papel de los mecanismos de fosforilación y desfosforilación en la regulación de la entrada de potasio, fue deducido de la identificación de Hal3 como un modulador tanto de la salida de sodio y litio como de la entrada de potasio (Ferrando *et al.*, 1995). Hal3 fue identificado como un regulador negativo de Ppz1, una proteína serina/treonina fosfatasa cuya influencia en la tolerancia a sal es conocida (de Nadal *et al.*, 1998). Se ha demostrado que el par Hal3/Ppz1 está involucrado en la correcta regulación del pH y la concentración intracelular de potasio en el transporte dependiente de Trk (Yenush *et al.*, 2002). Se ha observado que Trk1 está presente junto a los lípidos rafts de la membrana plasmática, donde físicamente interactúa con Ppz1. Trk1 es fosforilado *in vivo* y sus niveles de fosforilación se incrementan en los mutantes *ppz1 ppz2*. La estabilidad de la proteína y/o su localización subcelular no está alterada en los mutantes *ppz1 ppz2*. También se ha observado tanto la interacción como la inhibición de Ppz1 por Hal3 dependiente del pH, lo cual conduce a sugerir que la interacción Ppz1-Hal3 podría ser un sensor de pH intracelular que modula la homeostasis de H<sup>+</sup> y K<sup>+</sup>

a través de la regulación de Trk1, sin embargo la fosforilación directa de Trk1 por Ppz1 queda por demostrar (Yenush *et al.*, 2005). De manera similar se ha identificado una proteína fosfatasa calcineurina activada por calcio como elemento necesario para la transición del sistema de transporte Trk al estado de alta afinidad por potasio inducido por sodio, lo cual ayuda a discriminar el potasio del sodio (Mendoza *et al.*, 1994). La base de estos efectos se desconoce, aunque la calcineurina parece ser necesaria para la actividad de Trk1 bajo condiciones basales (Casado *et al.*, 2010).

La existencia de elementos de detección de nutrientes o reguladores de la integridad de la pared celular y la activación de vías de señalización han sido propuestas (Thevelein *et al.*, 2009), aunque nada ha sido reportado en cuanto a sensores específicos de cationes como el potasio o el sodio y muy poco se conoce acerca de los procesos involucrados en la adaptación a cambios en el potasio externo. Siguiendo una aproximación multidisciplinaria, recientemente se ha concluido que la homeostasis de potasio en la cepa silvestre es un ejemplo de adaptación no perfecta, donde la misma concentración intracelular (de salida) no se aproxima a los niveles extracelulares (de entrada). Además, se observó que la activación de Pma1 y los sistemas de bicarbonato están involucrados en la respuesta al ayuno de potasio (Kahm *et al.*, 2012). De hecho, Kahm y colaboradores han desarrollado un nuevo método de inferencia “algoritmo de seguimiento inverso” que permite predecir y verificar experimentalmente que el principal regulador bajo condiciones de ayuno de potasio son flujos de protones, que responden a cambios en las concentraciones de potasio. En contraposición a la opinión predominante, se demostró que la regulación de los principales sistemas de transporte (Trk1,2 y Nha1) en la membrana plasmática no es suficiente para lograr la homeostasis (Kahm *et al.*, 2012) (Figura 5).



**Figura 5. Mecanismo propuesto de homeostasis de potasio.** Cambios en las concentraciones externas de potasio son detectados por un sistema sensor no identificado, directa o indirectamente, por ejemplo, mediante el potencial de membrana, el potasio interno o cambios en el pH. La señal del sensor provoca una modulación de los flujos de protones usando el sistema de la reacción de bicarbonato y la bomba de protones Pma1 como reguladores (Adaptado de Kahm *et al.*, 2012).

En estudios de Haro y Rodríguez-Navarro, se reportó en 2003 un análisis mutacional de la hélice M2<sub>D</sub> del transportador ScTrk1, observándose que mutaciones sencillas afectaban la capacidad de transportar potasio (rubidio) en diferentes grados, pero la introducción de un sólo residuo de aminoácido cargado positivamente, prácticamente elimina la función de este transportador (Haro y Rodríguez-Navarro, 2003). Recientemente, se han utilizado mutantes de *trk* para estudiar la adaptación a la disminución de la concentración externa de potasio en levaduras que carecen del sistema Trk o expresan diferentes versiones de la mutación de la proteína Trk1, lo que permite sugerir que aunque Trk1 no es esencial para la adaptación a los cambios de potasio, la dinámica de la pérdida de potasio es muy diferente en la cepa silvestre en comparación con el mutante *trk1,2* o en levaduras que expresan versiones de Trk1 con características de transporte altamente defectuosas.

Debido a su papel en la modulación del equilibrio osmótico e iónico, así como en la captación de nutrientes, la actividad de la bomba electrogénica Pma1 debe ser estrechamente regulada. La glucosa es una importante señal para la regulación de Pma1 (Serrano, 1983). Esta regulación ocurre a dos diferentes niveles: un rápido incremento inicial de cinco a diez veces en la actividad catalítica ATPasa, afectando la K<sub>m</sub> (la cual disminuye) y la V<sub>max</sub> (la cual se incrementa), lo cual es seguido por una segunda fase que involucra un suave y moderado incremento en la expresión del gen en un proceso

que involucra los factores de transcripción Rap1 y Gcr1 (Portillo, 2000). Los niveles de expresión de *PMA1* pueden ser modulados en respuesta a cambios en las condiciones de crecimiento, como la fuente de carbono, cambios diauxicos (crecimiento bifásico que tiene lugar cuando hay presentes dos sustratos diferentes que pueden ser utilizados como fuentes de carbono), o entrada en la fase estacionaria y condiciones de estrés (Rao *et al.*, 1993; Fernandes y Sa-Correia, 2003).

Hay evidencias que sugieren que a corto plazo la regulación de la actividad de Pma1 por activadores puede involucrar la fosforilación de proteínas por residuos de serina y treonina, enfocando esta inhibición en el extremo C-terminal, ya que las mutaciones de este dominio afectan los residuos serina899 y treonina912, afectando la  $K_m$  dependiente de glucosa o la  $V_{max}$  (Portillo *et al.*, 1991). El papel de Ptk2, una proteína quinasa perteneciente a la familia NPR/HAL5, ha sido propuesto como un activador de Pma1 por fosforilación del residuo de serina 899 (Goosens *et al.*, 2000). Ptk2 está localizada en la membrana plasmática, y la fosforilación *in vitro* de la serina899 de Pma1 tras la incubación de membranas de levaduras, ha sido determinada como dependiente de Ptk2 (Lecchi *et al.*, 2007).

## 2.2. Sistemas de salida de cationes.

El proceso de salida de potasio de la célula se ha conocido durante mucho tiempo. Existe evidencia experimental de que tres diferentes transportadores pueden contribuir a la salida de potasio de la célula, dependiendo de las condiciones fisiológicas. Dos de estos han sido identificados como sistemas de expulsión de sodio, pero que también pueden mediar la salida de potasio (Ena1 y Nha1). El tercer sistema es específico para la salida de potasio (Tok1) (Ariño *et al.*, 2010).

Para mantener baja la concentración de sodio (o litio), *S. cerevisiae* utiliza dos tipos de sistema de salida en la membrana plasmática. Estos sistemas se complementan el uno con el otro en la función de desintoxicación, estos difieren tanto en el mecanismo de transporte como en la regulación de su expresión y actividad (Ariño *et al.*, 2010).

### ○ Canal Tok1.

Este es el único canal que expulsa potasio hacia el exterior de la célula en *S. cerevisiae*. Esta proteína tiene 691 residuos de aminoácidos (Miosga *et al.*, 1994) y su

secuencia corresponde a una proteína canal con ocho dominios transmembranales y dos lazos P. Los dos dominios P de Tok1 son estructuras similares. Cada uno de estos poros forma un canal permeable a potasio, la cola de carboxilo funcionaría para evitar el cierre de la parte del canal que da al espacio intracelular. A partir de experimentos electrofisiológicos se dedujo que la función primaria de Tok1 es la salida de potasio. La apertura del canal es promovida por la despolarización de la membrana (Bertl *et al.*, 1993; Fairman *et al.*, 1999). La actividad de Tok1p es modulada por el potasio externo (Loukin *et al.*, 1997; Vergani *et al.*, 1997), tanto en levaduras como en ovocitos de *Xenopus* (Ketchum *et al.*, 1995; Zhou *et al.*, 1995; Reid *et al.*, 1996;). La delección de *TOK1* elimina las corrientes de potasio observadas en los experimentos de patch clamp, mientras su sobreexpresión mejora esto (Reid *et al.*, 1996). Los mutantes *tok1* no presentan cambios en el contenido de potasio, la captación de rubidio o la salida de potasio, cuando los cationes fueron cuantificados por espectrometría de absorción atómica y sólo se observó el efecto de la mutación en los experimentos electrofisiológicos (Bertl *et al.*, 2003). Se conoce que el potasio acumulado en las células es probablemente liberado para regenerar el potencial de membrana (Bertl *et al.*, 1998).

- **-ATPasa Ena.**

Las ATPasas tipo P acoplan la hidrólisis de ATP al transporte de cationes contra gradientes electroquímicos formando una fosfoenzima intermedia (Catty *et al.*, 1997). El subtipo IID, ejemplificado por el sistema ENA corresponde a la subfamilia de ATPasas capaz de expulsar sodio, litio o potasio con diferentes capacidades (Benito *et al.*, 2002). *S. cerevisiae* contiene varias copias de genes que codifican para idénticas o muy similares proteínas ENA (Haro *et al.*, 1991; Martínez *et al.*, 1991; Garcíadeblas *et al.*, 1993; Wieland *et al.*, 1995). De acuerdo a esta secuencia, *ENA1* fue inicialmente propuesto como un gen que codificaba para una ATPasa de calcio tipo P (Rudolph *et al.*, 1989), su locus fue llamado *PMR2* (ATPasa relacionada a la membrana plasmática). En 1991 se observó su capacidad de expulsar sodio y litio y probablemente potasio, estableciendo su papel primario en la célula (Haro *et al.*, 1991). Usualmente en *S. cerevisiae* estos genes se encuentran en tandem repetitivos en el cromosoma IV. El número de copias varía entre las cepas.

El grupo ENA, particularmente *ENA1*, es el principal determinante de tolerancia a sodio en *S. cerevisiae*. La delección del grupo entero se traduce en una alta sensibilidad a sodio y litio (Ariño *et al.*, 2010) y un crecimiento limitado a pH alcalino (Haro *et al.*, 1991;



Platara *et al.*, 2006), mientras que la expresión de *ENA1* restaura la tolerancia a estos cationes. La expresión de *ENA1* de *S. cerevisiae* en otros hongos como *Schizosaccharomyces pombe* o en plantas, incrementa la tolerancia a sodio y litio y disminuye el contenido intracelular de estos cationes (Banuelos *et al.*, 1995). Aunque las bases moleculares que expliquen el transporte para cationes no han resueltas, se ha propuesto que la pequeña divergencia estructural entre Ena1 y Ena2 puede explicar porque la primera es más efectiva en la expulsión de sodio y la segunda más específica para litio (Weiland *et al.*, 1995). La secuencia de residuos de aminoácidos de las proteínas Ena condujo a la predicción de nueve o diez dominios transmembranales y su presencia en la membrana plasmática ha sido demostrada en *S. cerevisiae* como Ena1 y Ena2 y también en *Debaryomyces occidentalis* (Banuelos y Rodríguez-Navarro, 1998). Recientemente, se ha observado que la eliminación de los transportadores *ENA*, provoca una dependencia del sistema de expulsión de cationes (potasio y sodio) Nha1, alterando completamente el efecto de la ploídia en la tolerancia a litio y evocando una fuerte superioridad diploide (Zörgö *et al.*, 2013).

Mientras la expresión de la mayoría de los componentes estructurales de los sistemas de entrada y salida es esencialmente constitutiva, la expresión de *ENA1* (pero no de otros miembros del grupo) está dramáticamente incrementada por la exposición a altas concentraciones de sodio o litio o pH alcalino (Garcia-deblas *et al.*, 1993; Mendoza *et al.*, 1994; Posas *et al.*, 1995; Wieland *et al.*, 1995). La exposición a sal y alto pH causa la activación de diversas vías de señalización que están integradas en el promotor *ENA1*. Extraordinariamente, algunas de estas vías también son relevantes para el control de otros componentes de la homeostasis de cationes (Márquez y Serrano, 1996).

Anteriormente, hemos comentado que las proteínas Ppz y calcineurina regulan los flujos de entrada de potasio. Un hecho que da idea de la complejidad de la homeostasis de cationes en levadura, es que estas dos mismas proteínas también regulan la ATPasa Ena. En el caso de la calcineurina, que es un heterodímero compuesto de uno o dos subunidades catalíticas redundantes codificadas por dos genes (*CNA1* y *CNA2*), además de un gen regulatorio (*CNB1*); su relevancia en la homeostasis de cationes está demostrada por la sensibilidad a sodio, litio o el pH alto de los mutantes *cnb1* y en la cepa silvestre tratada con el inhibidor específico FK506 (Nakamura *et al.*, 1993; Mendoza *et al.*, 1994). Tanto la vacuola, a través del canal Yvc1 y el medio extracelular a través del canal Mid1-Cch1, han sido propuestos como la fuente para la entrada del calcio citosólico en el estrés salino. La activación de la calcineurina afecta la expresión sustancial de un número

de genes (Yoshimoto *et al.*, 2002). La activación del gen ocurre principalmente a través de la desfosforilación del factor de transcripción Crz1/Tcn1/Hal8 (Matheos *et al.*, 1997), los cuales entran entonces al núcleo y se unen a secuencias específicas conocidas como CDRE, presentes en los promotores responsables de calcineurina. *ENA1* ha sido conocido durante mucho tiempo como un objetivo transcripcional de la pareja calcineurina/Crz1 y la acumulación de sodio o litio suele ser atribuida en células deficientes de calcineurina, al menos en parte, a la disminución en la capacidad de salida como resultado de una inducción incorrecta de la expresión de *ENA1* (Mendoza *et al.*, 1994; Hirata *et al.*, 1995; Márquez y Serrano, 1996). Dos regiones de unión a Crz1 han sido identificadas en el promotor *ENA1* en las posiciones -813/-821 y -727/-719, con elementos “corrientes abajo”, los cuales son los más relevantes para la inducción del gen (Mendizabal *et al.*, 2001).

La propuesta regulación antagonista de *ENA1* por las rutas de la calcineurina y PKA (Hirata *et al.*, 1995), está basada en la observación de que el estrés por sodio disminuye los niveles intracelulares de AMP cíclico (Márquez y Serrano, 1996), lo que probablemente puede ser explicado por el hecho de que PKA puede fosforilar a Crz1, oponiéndose así a la acción de la calcineurina (Kafadar y Cyert, 2004). Aproximadamente el 40% de la respuesta transcripcional total frente al pH alto, parece ser mediada por la activación de la calcineurina (Serrano *et al.*, 2002; Platara *et al.*, 2006), en este caso como resultado de la inmediata entrada de calcio externo dentro del citosol a través del canal de calcio Cch1-Mid1 (Viladevall *et al.*, 2004). Recientemente, en levaduras se ha señalado que la alfa-arrestina Aly1/Art6 (una familia de proteínas adaptadoras del tráfico celular), una fosfoproteína, interactúa y es desfosforilada por el calcio y por la calcineurina, lo cual se requiere para mediar el tráfico de ácido aspártico y ácido glutámico hacia la vacuola, sugiriendo que esta desfosforilación sirve como un interruptor regulatorio para promover el tráfico en la vacuola mediado por Aly1 (O'Donnell *et al.*, 2013).

En cuanto a Ppz1 y Ppz2 son proteínas fosfatasas serina-treonina relacionadas a las enzimas tipo I codificadas en levaduras por *GLC7*. Los mutantes que carecen de Ppz1 presentan una marcada tolerancia a sodio y litio (Posas *et al.*, 1995); los mutantes *ppz2* no tienen este fenotipo, pero la delección de *PPZ2* mejora los fenotipos de *ppz1*. Mutantes simples *ppz1* y dobles *ppz1 ppz2* presentan un aumento en los niveles de ARN mensajero de *ENA1*, incluso en la ausencia de estrés; además, Ppz1,2 controla la expresión de *ENA*. *HAL3/SIS2*; fueron identificados simultáneamente como genes que confieren halotolerancia cuando se sobreexpresan (Ferrando *et al.*, 1995). Hal3 es necesario para la

total inducción de *ENA1* por estrés salino. El papel de Hal3 en la tolerancia a sal y en el ciclo celular, determinó que Hal3 era un regulador negativo de la subunidad de Ppz1 que actúa uniéndose a la subunidad catalítica C-terminal (de Nadal *et al.*, 1998; Clotet *et al.*, 1999). Hal3 es también capaz de unirse e inhibir a Ppz2 (Ruíz *et al.*, 2003).

El mecanismo preciso para la regulación de la expresión de las fosfatasa Ppz no está completamente resuelto. Los niveles basales más altos de lo normal de ARN mensajero de *ENA1* en el mutante simple *ppz1*, parecen estar completamente causados por la activación constitutiva de la vía calcineurina/Crz1 (Ruíz *et al.*, 2003). En los mutantes *ppz1 ppz2*, sin embargo, mecanismos regulatorios adicionales son activados, conduciendo a un alto nivel de expresión de *ENA1* incluso en la ausencia de estrés. Esto puede ser explicado sobre la base del control negativo ejercido por Ppz1,2 en la regulación de los transportadores Trk, lo cual tiene un efecto sustancial en la tolerancia a sal y el pH intracelular (Yenush *et al.*, 2002). Esto demuestra que la actividad no regulada de los transportadores Trk en los mutantes *ppz1 ppz2*, provoca la alcalinización intracelular, lo cual haría más activo al promotor *ENA1* en la ruta independiente de calcineurina (Ruíz *et al.*, 2003). Hay evidencias recientes, que indican que la hiperactivación de Ppz1 perjudicaría el transporte de potasio a través de los transportadores Trk1 y Trk2, lo que provocaría una disminución del pH intracelular y un aumento posterior en los niveles de AMP cíclico (González *et al.*, 2013).

- **-Antiportador Nha1.**

Aunque los antiportadores de  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  de la membrana plasmática representan sistemas de transporte conservados en todos los organismos (arqueas, bacterias, hongos, parásitos, insectos, plantas y mamíferos), sus estructuras, especificidad de sustrato y probables funciones celulares han divergido durante su evolución. Mientras muchos microorganismos y plantas usan gradientes internos de protones creados por la ATPasa de la membrana plasmática para bombear los cationes hacia fuera de la célula, las células animales usualmente consumen el gradiente de sodio resultando en una actividad  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  con el fin de forzar la salida de protones y regular el pH intracelular (Ariño *et al.*, 2010).

Existen estudios de actividad de Nha1 que señalan que puede actuar sobre el potasio y el rubidio. Estos datos representan la primera evidencia de que un miembro de la familia de antiportadores  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  demuestra especificidad por múltiples sustratos y está directamente relacionado en la salida de potasio. El antiportador Nha1 es responsable

del crecimiento celular a altas concentraciones de KCl y NaCl a pH ácido y la ATPasa Ena1 es necesaria a pH alto (Banuelos *et al.*, 1998).

La transcripción de *NHA1* es constitutiva y muy baja, y no muestra estar inducida por sales, cambios de pH o estrés osmótico, sugiriendo un papel en la homeostasis de potasio y pH intracelular. El papel de Nha1 en el mantenimiento del pH intracelular fue demostrado al medir el pH intracelular en células que carecían o sobreexpresaban Nha1, lo cual se confirmó por la observación de un incremento del pH en los mutantes *nha1* (Brett *et al.*, 2005).

Además de la función de desintoxicación de sodio y litio y su papel en el mantenimiento del potasio estable intracelular y los niveles de pH, la participación de Nha1 en otros procesos como la regulación del ciclo celular, volumen celular o potencial de membrana ha sido demostrado. También actúa como una válvula de seguridad frente a un aumento repentino de la alcalinización del citosol, cuando el gradiente de potasio hace que éste salga al exterior de la célula, lo cual permite la entrada de protones (Ortega y Rodríguez-Navarro, 1985; Banuelos y Rodríguez-Navarro 1998; Kinclova *et al.*, 2001). Estudios bioquímicos en Nha1 revelaron que está presente en la membrana plasmática como un dímero y la interacción de monómeros es importante para su actividad, además se localiza principalmente en fracciones de la membrana plasmática que son insolubles a detergentes y ricas en ergosterol. Las interacciones con lípidos rafts probablemente ocurren cuando Nha1 alcanza la membrana plasmática y para esta estabilización es necesaria la presencia de esfingolípidos (Mitsui *et al.*, 2009).

El antiportador Nha1 es una típica proteína de membrana cuya longitud es de 985 residuos de aminoácidos. Presenta una región N terminal hidrofílica muy corta de tan sólo doce residuos de aminoácidos con una orientación citosólica, seguidos por doce segmentos hidrofóbicos transmembranales conectados por lazos y terminada en un extremo C hidrofílico (Pribylova *et al.*, 2006).

La parte de la proteína que abarca la membrana, comprende aproximadamente 440 residuos de aminoácidos y se encuentra altamente conservada entre los antiportadores  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  y contiene muchos residuos de aminoácidos cargados, los cuales son importantes para la translocación de cationes metálicos y/o protones (Pribylova *et al.*, 2006). Al menos cinco residuos de aminoácidos cargados negativamente se encuentran altamente conservados, así como H367, los cuales son cruciales para la

función del antiporte  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  en la membrana plasmática de *S. pombe* y en otras levaduras (Dibrov y Fliegel, 1998; Wiebe *et al.*, 2003; Fliegel, 2005).

La principal función fisiológica de Nha1 es probablemente organizar y contribuir al esencial y continuo reciclado de potasio a través de la membrana plasmática. Su contribución a la desintoxicación de sodio y litio es significativa, pero no crucial. Nha1 parece estar involucrado por su capacidad de transportar potasio, en la homeostasis intracelular de potasio, así como del pH y consecuentemente actúa de manera rápida frente a los cambios externos de osmolaridad, ajuste de volumen celular y mantenimiento del potencial de la membrana plasmática (Ariño *et al.*, 2010). Recientemente, se ha identificado un homólogo de Nha1 de *S. cerevisiae* en *Hortaea werneckii*, una levadura extremadamente halotolerante que provoca infecciones en la piel humana (Lenassi *et al.*, 2013).

La expresión del gen *NHA1* parece ser bastante estable y no afectada por ninguna forma de estrés. Sin embargo, Nha1 es un importante componente de la respuesta celular temprana al estrés por sodio y es necesario para una respuesta adicional adaptativa transcripcional. Por ejemplo, un choque osmótico producido por altas concentraciones externas de sodio, causa la casi inmediata disociación de muchas proteínas (factores de transcripción, proteína de unión a la caja TATA) de la cromatina, además evitando la necesaria respuesta transcripcional adaptativa (por ejemplo, expresión de *ENA1*). Al producirse el choque osmótico, la quinasa Hog1 es activada por la vía de señalización HOG y rápidamente fosforila a Nha1 en su extremo C-terminal citosólico (presumiblemente T765 y T876). Estos eventos de fosforilación cambian la actividad de Nha1, por un mecanismo desconocido, y que se propone es necesario para la reasociación de la maquinaria transcripcional (Proft y Struhl, 2004). El mismo trabajo muestra también una participación, aunque menos relevante, del canal Tok1 en la respuesta temprana. Además, Hog1 se comportaría como un regulador clave tanto para las respuestas pretranscripcional como transcripcional, que son relevantes para la adaptación al estrés por cationes. Se ha observado que en respuesta al shock osmótico mediado por sorbitol, la fosforilación de Nha1 por Hog1 resulta en una inhibición transitoria de la salida de potasio. Esta disminución en la pérdida de potasio vía Nha1, ayuda a las células a hacer frente al choque osmótico y en el caso del estrés por sodio, un menor número de cationes de sodio entra a la célula, si menos potasio es liberado, esto resulta en un fenotipo detectable de incremento a la tolerancia a sodio (Ariño *et al.*, 2010).

### 3. Transporte de cationes a nivel intracelular.

La concentración de metales alcalinos dentro de las levaduras probablemente no es homogénea y se presume que hay diferencias en las cantidades de sodio y potasio en el citosol y en los organelos individuales. Esta necesidad fisiológica de transportar metales alcalinos a través de las membranas de los organelos se une al mantenimiento de la homeostasis de potasio y desintoxicación de sodio del citosol, así como la regulación del pH y el volumen celular. El mecanismo antiporte que intercambia protones por potasio y/o sodio ha sido descrito para cuatro organelos de *S. cerevisiae*. Dos de los antiportadores involucrados comprenden Nhx1 (endosomal) y Kha1 (aparato de Golgi), que pertenecen a la familia de intercambiadores  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ , los cuales incluyen a Nha1 localizado en la membrana plasmática (Brett *et al.*, 2005; Pribylova *et al.*, 2006). En contraste, el antiportador vacuolar Vnx1 y el mitocondrial Mdm38 tienen estructuras diferentes. Las actividades de los antiportadores Nhx1, Kha1 y Vnx1 están estrechamente interconectadas con la función de ATPasa vacuolar tipo V, lo cual crea un gradiente de protones a través de las membranas de estos organelos (Ariño *et al.*, 2010). También hay que mencionar a Vhc1, un simporte que media el cotransporte de cloro y potasio en la vacuola y es importante para la homeostasis de potasio y la tolerancia a sal. La mutación del gen *VHC1* incrementa la sensibilidad a altas cantidades de potasio, altera la morfología vacuolar y disminuye la sobrevivencia frente a un choque hiperosmótico (Petrezsélyová *et al.*, 2013).

#### 3.1. Transporte de cationes a través de la membrana mitocondrial interna.

Aunque el intercambio de potasio y protones a través de la membrana mitocondrial fue predicho por Peter Mitchell (1961) y validado directamente por mediciones de protones y flujos de potasio en mitocondrias aisladas de muchos organismos, incluyendo levaduras, el número, naturaleza y estructura de los correspondientes transportadores en levaduras permanece sin aclarar (Ariño *et al.*, 2010). El gen *MDM38/MKH1/YOL027c*, cuyo producto está localizado en la membrana mitocondrial interna, es indispensable para el intercambio  $\text{K}^+/\text{H}^+$ . Sin embargo, este gen probablemente no codifique el transportador por sí mismo, ya que su producto contiene solamente uno de los segmentos transmembranales hidrofóbicos. *MDM38*, el cual se encuentra bien conservado entre los eucariotas, fue aislado en una búsqueda de genes involucrados en la homeostasis de cationes en mitocondrias (Nowikovskiy *et al.*, 2004). Mitocondrias aisladas de mutantes de *mdm38*, muestran un muy reducido intercambio  $\text{K}^+/\text{H}^+$ , bajo potencial de membrana, alto contenido de potasio en la matriz e incremento

del volumen (Froschauer *et al.*, 2005). En caso de pérdida del antiportador  $K^+ / H^+$ , sobreviene el aumento de tamaño mitocondrial y la reducción del potencial de membrana, seguido por la fragmentación del retículo mitocondrial (Nowikovsky *et al.*, 2007). Todos estos datos confirman el papel importante del intercambio de potasio y protones en la fisiología de la mitocondria. Posteriormente otras dos proteínas, Mrs7 e Ydl183, con un papel en el intercambio  $K^+ / H^+$  han sido identificadas y la existencia de un complejo responsable del transporte ha sido sugerido (Zotova *et al.*, 2010).

### 3.2. Transporte vacuolar.

La vacuola es lugar donde las células secuestran el sodio tóxico y almacenan una parte sustancial del potasio intracelular. El intercambio de sodio y potasio por protones a través de la membrana vacuolar fue predicho hace mucho tiempo como el mecanismo de transporte para la acumulación de estos cationes en la vacuola. Su existencia ha sido confirmada en experimentos midiendo el flujo de cationes y protones con el uso de células permeabilizadas, electrodos selectivos y sondas fluorescentes (Hirata *et al.*, 1995; Calahorra *et al.*, 1998).

Por cerca de diez años, se creyó que Nhx1 era el principal antiportador involucrado en el transporte de sodio y litio a la vacuola, aunque su localización en las membranas endosomales y no en las membranas vacuolares ha sido observado (Nass y Rao., 1998). Se ha reportado un gen *VNX1* que codifica para un antiportador de cationes metálicos alcalinos/ $H^+$ , el cual ha sido identificado y su producto caracterizado (Cagnac *et al.*, 2007). La secuencia del gen *VNX1* corresponde a un antiportador  $Ca^{2+} / H^+$ . Se ha observado que Vnx1 se localiza en la membrana vacuolar y no media la captación de calcio, y tampoco no es indispensable para el intercambio vacuolar de sodio y potasio por protones (Cagnac *et al.*, 2007). Además, del secuestro de cationes metálicos alcalinos en el lumen vacuolar, Vnx1 también probablemente juega un papel en la homeostasis citosólica de iones y la regulación del pH intracelular, similar a el caso de los antiportadores Nha1 y Nhx1.

### **3.3. Transporte en aparato de Golgi y endosomas.**

#### **3.3.1. Transportador Kha1.**

De los tres antiportadores  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ , de levaduras, Kha1 ha sido el que más alto nivel de similaridad ha tenido con los antiportadores bacterianos de sodio o potasio/protón (Pribylova *et al.*, 2006). Aunque por algún tiempo se creyó que era un transportador de la membrana plasmática, después se observó que se localiza en la membrana del aparato de Golgi. Similar a otros antiportadores intracelulares de cationes metálicos/ $\text{H}^+$ , se cree que Kha1 está involucrado en la regulación del potasio intraorganelos y la homeostasis de pH (Flis *et al.*, 2005).

La delección de *KHA1* resulta en un crecimiento defectuoso en medio con alto pH o conteniendo higromicina B. No hay evidencia directa con respecto a la especificidad de sustrato de Kha1, pero probablemente es el potasio; la incapacidad del mutante *kha1* de crecer en pH alto puede ser suprimida mediante la adición de moderadas concentraciones de potasio (Maresova y Sychrová, 2005).

#### **3.3.2. Antiportador Nhx1.**

Nhx1 fue el primer antiportador intracelular descubierto y el mejor caracterizado. Fue identificado por la caracterización de fenotipos tolerantes a sodio del mutante  $\text{H}^+$ -ATPasa *pma1- $\alpha$ 4* y aunque hay reportes de su localización en la mitocondria, ha sido demostrado que está localizado en las membranas de los compartimentos prevacuolares, como los endosomas tardíos. El antiportador Nhx1 tiene múltiples funciones en las levaduras. Contribuye al secuestro del sodio y litio tóxico, y al del exceso de potasio en los endosomas y las vacuolas y está involucrado en el primer estado de adaptación de la célula a un choque hiperosmótico. Además, su actividad contribuye significativamente al mantenimiento de un pH intracelular estable. Un análisis mutacional de Nhx1 reveló una conexión directa entre su función en la regulación de la homeostasis de pH y el tráfico de vesículas (Nass y Rao, 1998; Bowers *et al.*, 2000). La delección del gen *NHX1* resulta en un incremento de la sensibilidad a sal y pH bajo, junto con una caída del pH citosólico (Brett *et al.*, 2005). La delección del gen *NHX1* en un fondo que carece de los transportadores de la membrana plasmática *Nha1* y *Ena1-4* provoca una extrema sensibilidad no sólo a sodio, sino también a potasio, litio y rubidio (Kinclova-Zimmermannova *et al.*, 2004), lo cual sugiere una amplia especificidad de este antiportador. Su capacidad para transportar rubidio fue confirmada en un ensayo de transporte (Brett *et al.*, 2005).



Los antiportadores de los endosomas y el aparato de Golgi, Nhx1 y Kha1, respectivamente, es probable que tengan una función común; vale la pena señalar que aunque la delección de ambos genes resulta en una disminución en la tolerancia a higromicina B, la sobreexpresión de Kha1 no suprime la sensibilidad a higromicina B de los mutantes *nhx1* (Maresova y Sychrová, 2005). Por otra parte, la delección de los dos genes afecta el crecimiento de las células a valores limitantes de pH externo y conduce a una sensibilidad a bajos (Nhx1) o altos (por la ausencia de Kha1) valores de pH externo. En definitiva, se ha sugerido que Nhx1 y Kha1, junto con la ATPasa vacuolar, estarían involucrados en el equilibrio de pH intraorganelos versus cationes metálicos alcalinos, lo cual influiría en el tráfico de vesículas entre los organelos de las rutas secretoras y endosomales (Ariño *et al.*, 2010).

#### **4. Distribución intracelular de cationes.**

Anteriormente ha sido reportado por varios grupos que la levadura modelo *S. cerevisiae* es capaz de crecer en un amplio rango de concentraciones externas de potasio, que la concentración intracelular usualmente está comprendida entre 200 a 300 mM bajo condiciones normales de crecimiento y que disminuye por la limitación de potasio o la presencia de altas cantidades de sodio. Además, *S. cerevisiae* tiende a acumular potasio en contra de altos gradientes de concentración, y el principal transportador de la membrana plasmática Trk1 juega un papel fundamental en este proceso (Rodríguez-Navarro, 2000; Ariño *et al.*, 2010). Dos recientes estudios a nivel genómico, han identificado múltiples genes a partir de diferentes categorías funcionales involucradas en la homeostasis de potasio, destacando la complejidad del proceso (Barreto *et al.*, 2011; Fell *et al.*, 2011). La localización subcelular de cationes bajo diferentes condiciones externas no ha sido definitivamente esclarecida, a pesar del hecho de que la compartimentalización subcelular es crítica para la fisiología celular de los eucariotas, y por ejemplo es generalmente aceptado que el secuestro vacuolar de sodio juega un papel importante tanto en levaduras como en plantas (Tuteja, 2007; Jiang *et al.*, 2010). La existencia de transportadores de  $K^+/Na^+$  en organelos como las vacuolas y el endosoma/compartimentos prevacuolares (Brett *et al.*, 2005; Cagnac *et al.*, 2007; Cagnac *et al.*, 2010) o en mitocondria (Zotova *et al.*, 2010), refuerza el posible papel fisiológico de la compartimentalización de cationes.

Mediante microanálisis de energía de dispersión de rayos X, fue reportado hace más de treinta años, que la distribución intracelular de potasio, rubidio y cesio era muy similar, y que las concentraciones de estos iones en el citoplasma fueron aproximadamente iguales a las presentes en el núcleo y dos veces la cantidad encontrada en la vacuola (Roomans y Sevéus, 1976). Sin embargo, posiblemente debido al hecho de que la técnica no estaba fácilmente disponible para muchos grupos o porque estos experimentos fueron desarrollados bajo condiciones no fisiológicas (previo al análisis, las células fueron suspendidas en agua por un día), el hecho es que dicho trabajo no tuvo el impacto y la significancia que este pudo haber tenido. El único enfoque utilizado para investigar la pregunta de la localización subcelular de cationes en levaduras es el uso de sustancias como el citocromo C (Okorokov *et al.*, 1980; Venema *et al.*, 2003; Montiel y Ramos, 2007), DEAE dextrano (Perkins y Gadd, 1993) o digitonina (de Nadal *et al.*, 1999) para permeabilizar la membrana plasmática. Este es un método conveniente y rápido, pero la principal limitación de este procedimiento es que los resultados son demasiado simplistas, ya que éste usualmente considera dos compartimentos importantes, donde los cationes están presentes en cantidades significativas; el potasio es extraído después de una permeabilización que es considerada la fracción citoplasmática, mientras que la cantidad restante es asignada a la vacuola. Después de usar estos procedimientos, muchas de las investigaciones concluyeron que los cationes acumulados en la fracción vacuolar son significativamente más altos que los de la fracción citoplasmática (Okorokov *et al.*, 1980; Perkins y Gadd, 1993; Montiel y Ramos, 2007), lo cual está en contradicción con lo previamente publicado por Roomans y Sevéus.

En esta investigación, se ha optimizado un procedimiento para determinar la localización subcelular de potasio y sodio en *S. cerevisiae* bajo diferentes condiciones de cultivo. Se ha aplicado el mismo procedimiento para cuatro mutantes vacuolares y se ha concluido que mientras las vacuolas acumulan la mayoría del potasio y el sodio intracelular, el citosol contiene cantidades relativamente bajas de estos cationes. Sin embargo, la concentración de potasio en el citosol se mantuvo bastante constante durante el ayuno de potasio y para éste propósito el potasio vacuolar ha de ser rápidamente movilizado. También se determinó que la distribución intracelular estaba alterada en los cuatro mutantes con una fisiología vacuolar afectada. En todas las cepas estudiadas el núcleo mantuvo un porcentaje importante y relativamente constante del total de potasio y sodio intracelular.



## **OBJETIVOS**

El objetivo general de esta tesis es profundizar en el estudio de la homeostasis de cationes alcalinos en *Saccharomyces cerevisiae*.

### **Los objetivos específicos de esta Tesis son:**

- Establecer un protocolo y determinar la distribución intracelular de cationes alcalinos (potasio y sodio) en diversas cepas de *Saccharomyces cerevisiae*.
  
- Estudiar el papel del transportador Trk1 en la estabilización del contenido intracelular de potasio frente a cambios en los niveles externos.



## Materiales y Métodos

### 1. Material Biológico.

En el presente estudio se ha utilizado las levaduras de genotipo silvestre *Saccharomyces cerevisiae* (BY4741 y W303.1A) y mutantes isogénicos de ambas cepas que se presentan a continuación en la Tabla 1.

**Tabla 1. Levaduras estudiadas en este trabajo.**

Nombre	Genotipo Relevante	Referencia
BY4741	MATa his3Δ1 leuΔ0 met15Δ0 ura3Δ0	EUROSCARF
<i>Δptc1</i>	<i>ptc1::NAT1</i>	EUROSCARF
<i>Δvam6</i>	<i>vam6::kan MX4</i>	EUROSCARF
<i>Δvnx1</i>	<i>vnx1::LEU2</i>	EUROSCARF
<i>Δnhx1</i>	<i>nhx1::LEU2</i>	EUROSCARF
<i>Δtrk1Δtrk2</i>	Mata his3-D1 leu2D met15D ura3D <i>trk1::KAN trk2::NAT</i>	EUROSCARF
W303.1A	MATa ade-2-1 his3-11 15 ura3-1 leu2-3 112 trp1	Haro y Rodríguez Navarro, A. 2003
WΔ6	MATa ade-2-1 his3-11 15 ura3-1 leu2-3 112 trp1 <i>trk1::LEU2 trk2:: HIS3</i>	Haro y Rodríguez-Navarro, A. 2003
W303.1A pFL2	W303.1A [pFL2]	Grupo Prof. Ramos
WΔ6 pFL2	WΔ6 [pFL2]	Grupo Prof. Ramos
WΔ6 pTRK24- K1147N	WΔ6 [pTRK24]	Haro y Rodríguez-Navarro, A. 2003
WΔ6 pTRK24- M1153R	WΔ6 [pTRK24]	Haro y Rodríguez-Navarro, A. 2003
WΔ6 pTRK24	WΔ6 [pTRK24]	Haro y Rodríguez-Navarro, A. 2003
WΔ6 pFL15	WΔ6 [pFL15]	Haro y Rodríguez-Navarro, A. 2003
WΔ6 NcHAK1	WΔ6 [NcHAK1]	Grupo Prof. Rodríguez- Navarro

### 2. Reactivos y enzimas.

Los reactivos utilizados fueron de grado analítico y procedían de Merck (Darmstadt, Alemania), Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, EEUU) y Amresco (Solon, Ohio, EEUU). La liticasa 100 KU usada fue de Sigma-Aldrich. Las sales de KCl y NaCl eran de Merck de calidad purísimo.

### 3. Medios de cultivo y condiciones de crecimiento.

Las levaduras utilizadas en este estudio se cultivaron en distintos medios según el objetivo del ensayo. El crecimiento siempre se desarrolló a 28°C y con agitadores orbitales para el cultivo en medio líquido. El medio YPD (Tabla 2) se utilizó para el crecimiento rutinario de las levaduras, ya que es un medio complejo con todos los nutrientes necesarios para estos microorganismos. Para las cepas con marcadores auxotróficos, ya sea integrados o conferidos por plásmidos, se utilizó el medio YNB-Formedium® (Tabla 2), con los aminoácidos y bases nitrogenadas necesarias, y eliminando el aminoácido o base nitrogenada que actuó como marcador. Estos elementos esenciales se añadieron en las siguientes concentraciones; histidina (40 mg/L), leucina (60 mg/L), triptófano (40 mg/L), adenina (20 mg/L) y uracilo 40 (mg/L) (Sherman, 1991). Para la preparación del medio sólido se añadió 2% de agar. El pH del medio fue ajustado a 5,8 con amoníaco.

Los medios fueron esterilizados en autoclave a 121°C, una atmósfera de presión por 20 minutos. El potasio y el sodio fueron añadidos en forma de cloruros (KCl y NaCl) en las concentraciones indicadas para cada ensayo, esterilizándose junto a los medios.

**Tabla 2. Medios de cultivos utilizados en levaduras.**

Medio	Composición	Referencia
YPD	2% D-glucosa, 2% peptona, 1% extracto de levadura	Sherman, 1991
YNB-Formedium®	1,63 g/L YNB-Formedium, 1,285 g/mL Brent supplement mix, 2% D-glucosa, 4 g/L (NH <sub>4</sub> )SO <sub>4</sub> , 10 mM Mg SO <sub>4</sub>	Navarrete <i>et al.</i> , 2010

#### 3.1. Crecimiento en medio sólido.

El mantenimiento de las levaduras en medio sólido se realizó por estrías. Para los ensayos de goteo destinados a determinar los requerimientos de potasio y el efecto de drogas catiónicas (trimetilamonio e higromicina B), se hicieron diluciones seriadas de 1:10 a partir de una suspensión inicial de 3X10<sup>4</sup> células por mililitro (DO<sub>600</sub>) y se inocularon en placas de medio sólido gotas de 5 µL. Estas muestras se incubaron por un período de 48-72 horas a una temperatura de 28°C.

### **3.2. Crecimiento en medio líquido.**

En estos ensayos fueron inoculados con el medio adecuado, matraces de distinto volumen, dependiendo del tipo de ensayo, manteniéndolos usualmente en un agitador orbital entre 100-200 rpm a 28°C y durante el tiempo requerido para obtener la densidad óptica en cada experimento. La absorbancia se midió a 600 nm en un espectrofotómetro Beckman DU 640. En los experimentos destinados al estudio de la distribución intracelular de cationes las levaduras fueron cultivadas en medio YPD o utilizando este medio suplementado con sodio (0,8 M NaCl). Cuando fue necesario el ayuno de potasio (por cuatro horas) se utilizó el medio YNB-Formedium®. En general, las células fueron recogidas durante la fase exponencial de crecimiento a una densidad óptica ( $DO_{600}$ ) entre 0,3-1,0. En el caso del mutante *nhx1* cultivado en 0,8 M de NaCl, éste se recogió a una densidad óptica de 0,2-0,3 ( $DO_{600}$ ).

En los ensayos de curvas de crecimiento de *S. cerevisiae* BY4741 y sus mutantes isogénicos (Tabla 1) se utilizó el medio YPD con o sin sodio (0,8 M NaCl). Se partió de un inóculo inicial de 0,05 ( $DO_{600}$ ) y el crecimiento fue seguido utilizando un espectrofotómetro Beckman DU 640 por un período de 25 horas, midiéndose las correspondientes densidades ópticas cada hora

En los experimentos destinados a determinar el establecimiento de un estado estable de potasio en las distintas levaduras estudiadas, estas se crecieron en medio YNB-Formedium® suplementado con la concentración adecuada de potasio.

### **4. Aislamiento de organelos.**

En términos generales, para el aislamiento de vacuolas, retículo endoplasmático, aparato de Golgi, núcleos y mitocondrias se siguió un procedimiento muy similar (Figuras 6, 7 y 8) hasta la obtención de los esferoplastos (homogeneizado total).

#### **4.1. Aislamiento de vacuolas**

El aislamiento de las vacuolas se basó en el método descrito por Ohsumi y Ankaru (1981) y Martínez-Muñoz y Peña (2005), con modificaciones menores (Figura 6). Las células se recogieron por centrifugación a 4000 rpm durante 5-10 minutos y la pella (se descartó el sobrenadante) se resuspendió en 50 mL de tampón de digestión



(50 mM Tris-HCl, pH 7,5 y 1,2 M sorbitol). Se adicionaron luego liticasa 100 KU (2 mg/g de células) y 1 mM de  $\beta$ -mercaptoetanol y se agitó a 90 rpm durante una hora a 30°C. Luego se recogieron los esferoplastos mediante centrifugación a 3000 rpm durante 5 minutos a 4 °C (descartando el sobrenadante), y se resuspendió la pella en 90 mL de tampón de digestión frío, volviéndose a centrifugar en las mismas condiciones anteriores. A los esferoplastos obtenidos (homogeneizado total) se les añadió 25 mL de tampón A (10 mM MES-Tris, pH 6,9; 12% Ficoll-400; 0,1 mM MgCl<sub>2</sub> y 1/200 (v/v) de coctel de inhibidores de proteasas y se mezcló bien con una pipeta Pasteur desechable, y con homogenizador de vidrio pre-enfriado (para incrementar la lisis). El homogeneizado se incubó por 20 minutos en hielo y a continuación se transfirió a nuevos tubos de ultracentrífuga (Beckman Ultra-Clear centrifuge tubes 25x28 mm) previamente enfriados. Se adicionó una sobrecapa de tampón A hasta completar los tubos y se centrifugó a 24000 rpm durante 60 minutos (centrífuga Beckman SW-28). Tras esta centrifugación, las vacuolas flotando en la superficie se recogieron con una espátula y se transfirieron a nuevos tubos de ultracentrífuga que contenían 10 mL de tampón A, donde se resuspendieron. Luego se adicionó una sobrecapa de aproximadamente 20 mL de tampón B (10 mM MES-Tris, pH 6,9; 8% ficoll-400; 0,5 mM MgCl<sub>2</sub> y 1/1000 (v/v) de coctel de inhibidores de proteasas) y se volvió a centrifugar en las condiciones anteriores. Las vacuolas se recogieron con una espátula (como se ha explicado anteriormente) y se resuspendieron en 5 mL líquido de extracción (0,2 M HCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>)

En la determinación de la actividad V-ATPasa en vacuolas se utilizó el método de Cagnac *et al.*, (2007) con algunas modificaciones menores. Para cada ensayo se utilizó el volumen de vacuolas correspondiente a unos 25 $\mu$ g de proteína total, que se adicionaron a una cubeta de plástico desechable que contenía el tampón de reacción constituido por 5 mM Tris-MES, pH 7,5; 50 mM de TMA-Cl (cloruro de tetrametilamonio); 5  $\mu$ M de naranja de acridina y 3,125 mM de MgSO<sub>4</sub>, 1mM de azida de sodio (inhibidor de la F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>ATPasa) y 1 mM de vanadato de sodio (inhibidor de las ATPasas tipo P) (Onken y Putzenlechner, 1995).

La actividad V-ATPasa vacuolar se inició mediante la adición de 2,5 mM de Tris-ATP, pH 7,5; y los cambios dependientes de fluorescencia fueron seguidos usando un fluorímetro (SPECTRAFluor Plus, TECAN) por 5 minutos cada 20 segundos (longitud de onda de excitación 485 nm y longitud de onda emisión 535 nm). La actividad V-ATPasa fue inhibida mediante la adición de 1  $\mu$ M de Bafilomicina A (inhibidor específico de la

enzima V-ATPasa). La actividad V-ATPasa vacuolar fue definida como la diferencia entre la actividad obtenida con y sin 1  $\mu$ M de Bafilomicina A.

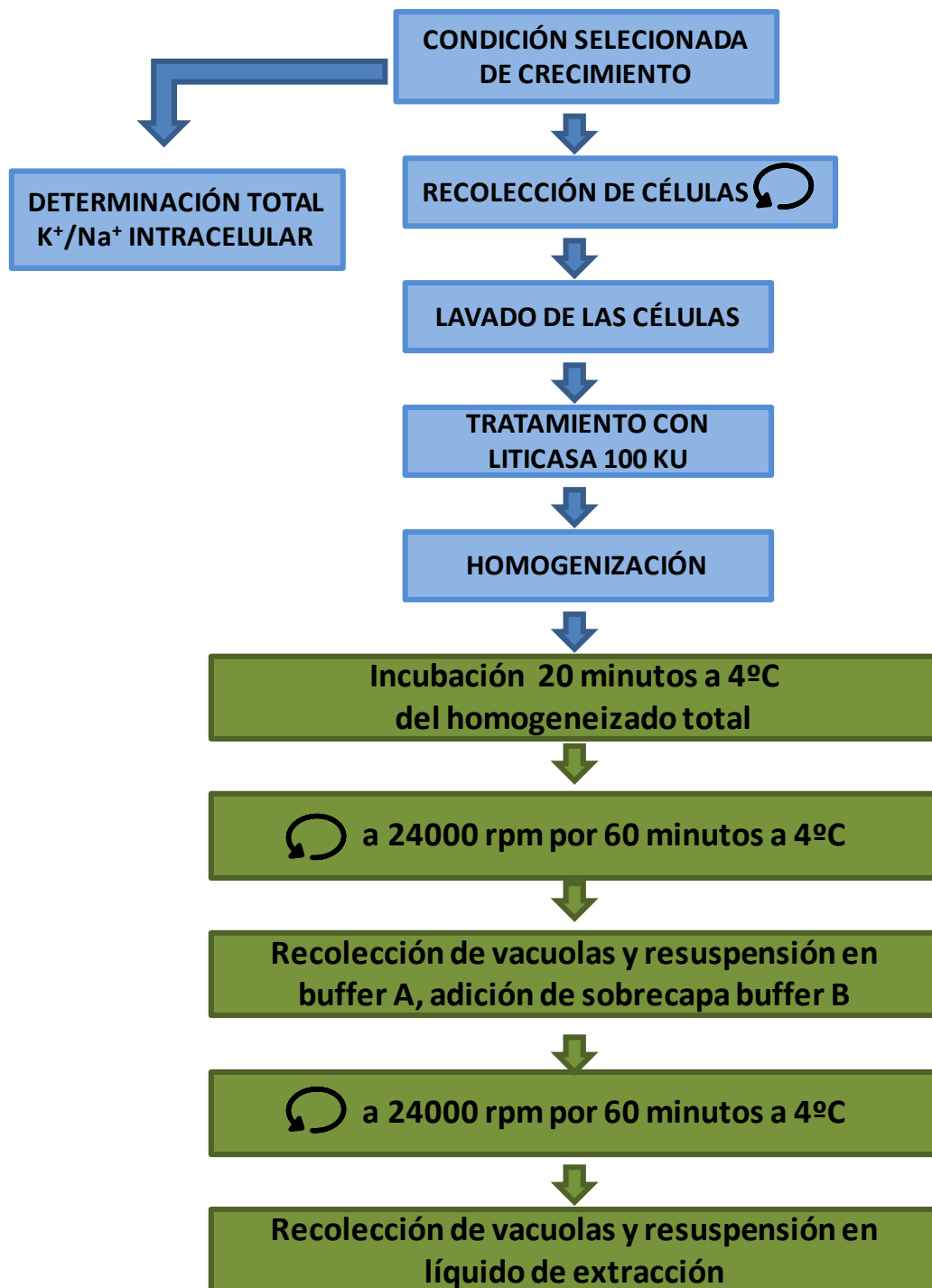


Figura 6. Esquema del método de aislamiento de vacuolas.  corresponde a una centrifugación.

#### **4.2. Aislamiento de núcleos.**

El aislamiento de núcleos de levaduras fue desarrollado siguiendo el procedimiento descrito por Zhang y Reese (2006) (Figura 7). Las células se recogieron por centrifugación a 4500 rpm por 5 minutos a 4°C, eliminando el sobrenadante y manteniendo las células en hielo. Se resuspendió la pella en 30 mL de buffer de lavado de sorbitol (1,4 M sorbitol, 40 mM HEPES-(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, pH 7,5; 0,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM polimetilsulfonil fluoruro y 10 mM beta-mercaptoetanol) y se transfirió a tubos de 50 mL. Las células fueron recogidas por centrifugación a 4500 rpm por 5 minutos a 4°C. Se eliminó el buffer de lavado tanto como fue posible por aspiración y se mantuvo en hielo. Este paso se repitió una vez más.

En la preparación de los esferoplastos, se pesó y resuspendió la pella en 4 mL de buffer de digestión de sorbitol (1,4 M sorbitol, 40 mM HEPES-(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, pH 7,5; 0,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM polimetilsulfonil fluoruro (PSMF) y 2 mM beta-mercaptoetanol y 1/200 (v/v) coctel de inhibidores de proteasas ). Se incubó la suspensión de células a 30°C por 10 minutos en el tubo de centrifuga con una agitación muy suave, luego se añadió liticasa 100 KU (2 mg/g de célula), y se incubó a 30°C muy suavemente (90 rpm) por 20 minutos. Luego, se examinó la suspensión celular para verificar la extensión de la digestión. Se tomó una alícuota de 1-2 µL y se examinaron al microscopio para determinar que casi todas las células se habían convertido en esferoplastos, la formación de esferoplastos fue confirmada por lisis hipotónica. Se añadió entonces buffer de digestión de sorbitol frío para intentar alcanzar un volumen de buffer añadido a la pella celular de 30 mL. Por ejemplo, si la pella fue resuspendida en 4 mL, se añadieron 26 mL de buffer y se centrifugó a 4500 rpm por 5 minutos a 4°C. Seguidamente se preparó una alícuota del buffer de sorbitol suplementado con 1mM de PMSF y colocó en hielo. Esto se hizo en el paso previo a la centrifugación. Completa, pero suavemente se resuspendió la pella en 30 mL de buffer de sorbitol frío (con 1 mM de PMSF). Se centrifugó a 4500 rpm por 5 minutos a 4°C y se removió tanto como fue posible el buffer y manteniéndose en hielo, este paso se repitió. Seguidamente se resuspendió la pella en 20 mL de buffer de ficoll frío (18% de ficoll, 20 mM PIPES-NH<sub>3</sub>, pH 6,5; 0,5 mM MgCl<sub>2</sub>) y se transfirió a un homogenizador de vidrio pre-enfriado y se homogenizó de 6 a 8 golpes siempre en hielo. Paralelamente, se preparó 20 mL de buffer de glicerol-ficoll frío (7% ficoll, 20% glicerol, 20 mM PIPES-NH<sub>3</sub>, pH 6,5; 0,5 mM MgCl<sub>2</sub>) suplementado con 1 mM de PMSF en un tubo de 50 mL y manteniéndose en frío. Se colocó suavemente el homogeneizado en la parte superior del buffer (las dos fases estaban separadas claramente). Luego se recogieron los

núcleos por centrifugación a 21500 rpm por 30 minutos a 4°C y se aspiró el sobrenadante completamente. Seguidamente, se resuspendió la pella en 20 mL de buffer ficoll. El contenido del tubo fue agitado a máxima velocidad mediante un vortex por 2,5 minutos, y fue colocado en frío por 5 minutos, y se volvió a agitar por otros 2,5 minutos para un total de 5 minutos de agitación. Se centrifugó la muestra a 3300 rpm por 15 minutos a 4°C y el sobrenadante fue cuidadosamente transferido a un tubo de 50 mL, evitándose la pella la cual se eliminó. Este paso eliminó las células intactas así como residuos. Se centrifugó el sobrenadante a 21500 rpm por 30 minutos a 4°C, se eliminó el sobrenadante y la pella fue resuspendida en líquido de extracción.

Para estimar la proporción de núcleos recuperados, 100 µL de la suspensión de núcleos fue diluída en 900 µL de buffer de digestión de sorbitol y medidos a una longitud de onda de 600 nm. La lectura fue de 0,185 por gramo de célula, lo cual concuerda con el procedimiento descrito por Zhang y Reese (2006). Adicionalmente, el número de núcleos fue determinado en esferoplastos y fracción nuclear usando el método de Prescott-Breed (1910) con ligeras modificaciones. Básicamente, los esferoplastos y la fracción nuclear fueron teñidos en portaobjetos y equilibrados con 1% buffer fosfato salino (PBS). Luego se les añadió DAPI (1:300 a partir de una solución madre de 1 mg/mL) y las muestras fueron incubadas a temperatura ambiente por 5 minutos. La distorsión en la fluorescencia fue eliminada añadiendo Slowfade® (Gold antifade reagents, Life technologies). Las muestras fueron observadas y contadas utilizando un microscopio de fluorescencia con lámpara Mercury-arc (el máximo de excitación del DAPI al unirse al dsADN es 358 nm y el máximo de emisión es 461 nm).

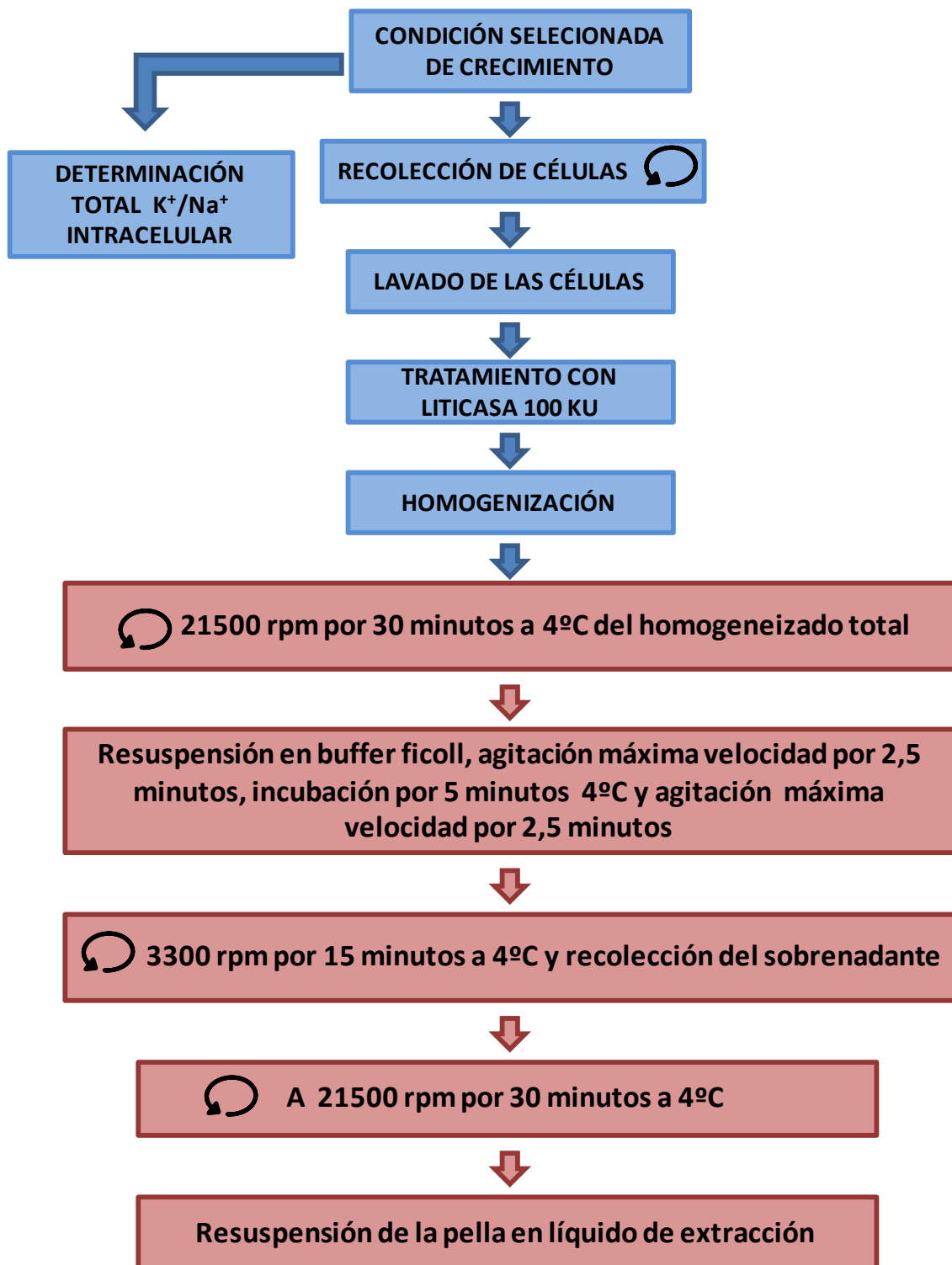


Figura 7. Esquema del método de aislamiento de núcleos.  corresponde a una centrifugación.

### 4.3. Aislamiento de mitocondrias.

El aislamiento de mitocondrias fue desarrollado siguiendo el procedimiento descrito por Zotova *et al.*, 2010 con modificaciones menores (Figura 8). Las células fueron recogidas por centrifugación a 3500 rpm por 5 minutos a 4°C y la pella fue resuspendida en 50 mL de buffer 1 M Tris-SO<sub>4</sub> pH 9,4 suplementado con 250 µL de una solución 2 M de DTT (ditiotreitól) e incubado 15 minutos a 37°C, luego se centrifugó a 3500 rpm por 5 minutos a 4°C, se descartó el sobrenadante y se resuspendió la pella en 30 mL de 2,4 M sorbitol, 0,2 M NH<sub>4</sub>PO<sub>3</sub>, pH 7,4; centrifugándose nuevamente a 3500 rpm por 5 minutos a 4°C. Seguidamente se resuspendió la pella en 30 mL de 2,4 M sorbitol, 0,2 M NH<sub>4</sub>PO<sub>3</sub>, pH 7,4; y se añadió liticasa 100 KU (2 mg/g de células), incubándose la suspensión por 55 minutos a 28°C a 90 rpm, luego se centrifugó a 3500 rpm por 5 minutos a 4°C y se resuspendió en 30 mL de 2,4 sorbitol, 0,2 M NH<sub>4</sub>PO<sub>3</sub>, pH 7,4 y 1/200 (v/v) de coctel de inhibidores de proteasas; nuevamente se centrifugó a 3500 rpm por 5 minutos a 4°C; y se resuspendió la pella en 40 mL de 2,4 M sorbitol, 0,2 M Tris-HCl, pH 7,4; transfiriéndose este contenido a un homogenizador de vidrio pre-enfriado. La muestra se centrifugó a 3500 rpm por 5 minutos a 4°C, se recogió el sobrenadante y se volvió a centrifugar bajo las mismas condiciones dos veces, luego el sobrenadante se recogió y fue centrifugado a 10000 rpm por 10 minutos; se descartó el sobrenadante y se resuspendió la fracción mitocondrial en líquido de extracción.

En la determinación del porcentaje de mitocondrias recuperadas en la fracción mitocondrial se utilizó la actividad citocromo C oxidasa, la cual es una actividad específica de la membrana mitocondrial interna. Se preparó el citocromo C reducido diluyéndolo en buffer fosfato (6,2 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 33,8 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,24% tritón X-100) a 2,7 mg/mL y fue reducido por la adición de 12 µL de 1% ditionito sódico por cada mL de citocromo C oxidado. Para comprobar la reducción del citocromo C, se diluyó 10 veces en tampón fosfato y se midió el cociente entre la absorbancia que entre 550 nm y 565 nm debe estar entre 6-9 ( $Abs_{550}/Abs_{565}=6-9$ ). Este ensayo se realizó en un espectrofotómetro Beckman DU 640, añadiendo a la cubeta (de 3 mL) 900 µL de buffer fosfato y 100 µL de citocromo C reducido. Luego se añadió 50 µL de muestra (25-30 µg de proteína) a 30°C durante 2 minutos con agitación continua. La oxidación del citocromo se midió mediante la disminución de la absorbancia a 550 nm por 30 segundos (Yonetani, 1965 y Trounce *et al.*, 1996).

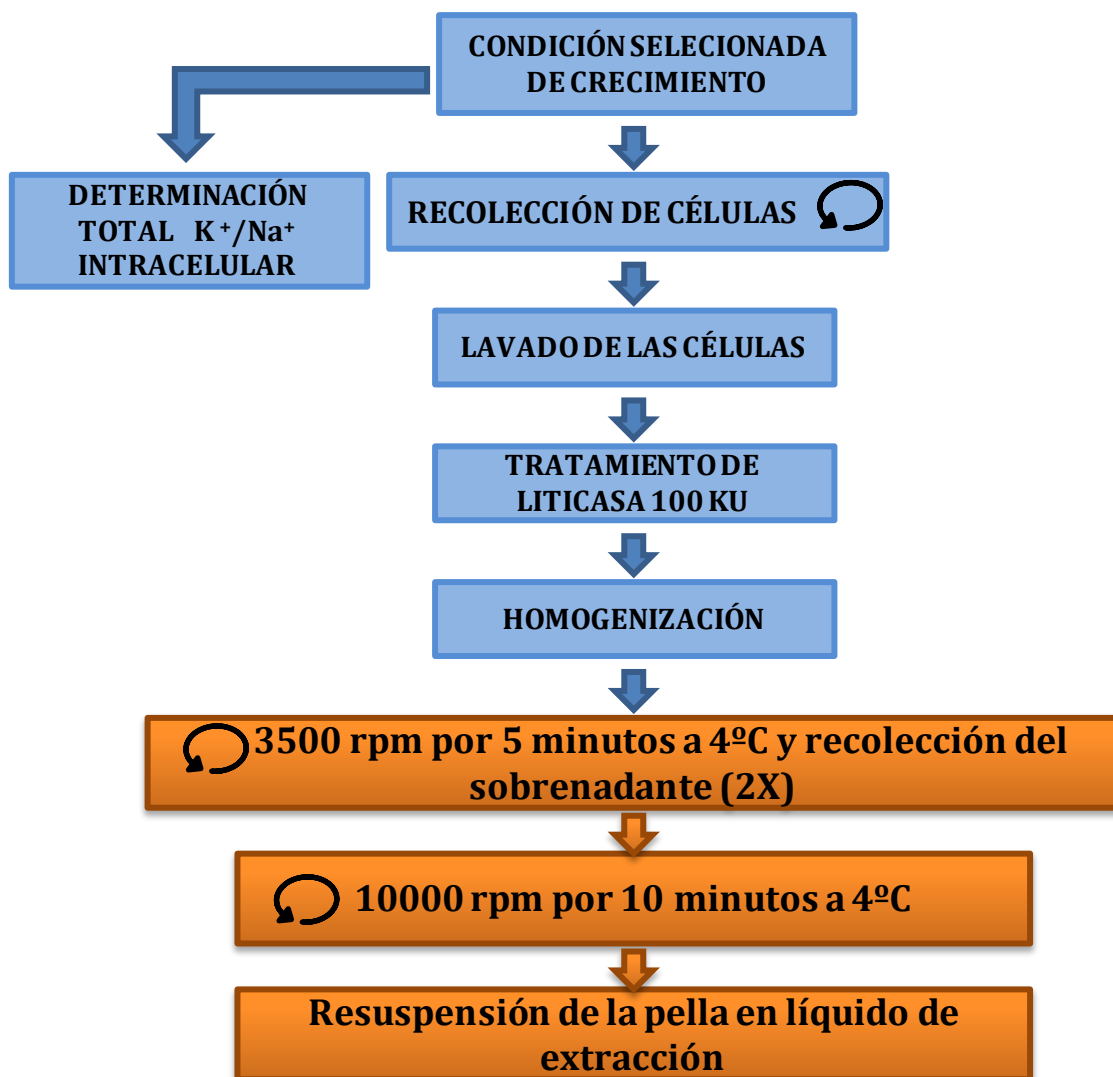


Figura 8. Esquema del método de aislamiento de mitocondrias.  corresponde a una centrifugación.

#### 4.4. Aislamiento de retículo endoplasmático.

El aislamiento del retículo endoplasmático fue desarrollado utilizando un producto comercial de obtención del retículo endoplasmático de Sigma® (Endoplasmic Reticulum Isolation Kit) con modificaciones menores (Figura 9). Para la obtención del homogeneizado total se siguió, fundamentalmente, el método descrito por Ohsumi y Ankaru (1981) y Martínez-Muñoz y Peña (2005), que se describe anteriormente en el apartado de aislamiento de vacuolas. A los esferoplastos obtenidos se les añadieron 25 mL de tampón A (MES-Tris 10 mM, pH 6,9; Ficoll-400 12%; MgCl<sub>2</sub> 0,1 mM y 1/200 (v/v) de

coctel de inhibidores de proteasas y mezcló bien con una pipeta Pasteur desechable, y con homogeneizador de vidrio (para incrementar la lisis).

El homogeneizado total se centrifugó a 1500 rpm por 10 minutos a 4°C. Se eliminó la pella y el sobrenadante fue transferido a otro tubo de centrifuga. Luego se centrifugó a 12000 rpm por 15 minutos a 4°C, cuidadosamente se eliminó la capa de lípidos flotantes, descartándose la pella. El sobrenadante obtenido correspondía a la fracción post mitocondrial (FPM) que contiene el retículo endoplasmático. Seguidamente se midió el volumen de la fracción post mitocondrial (mL) y se preparó un volumen de 8 mM de una solución de cloruro de calcio equivalente a 7,5 veces el volumen de la fracción post mitocondrial. Esta fue transferida a un vaso de precipitado (un tamaño de 10 veces el volumen de la fracción post mitocondrial) con agitación magnética por 15 minutos a 4°C. Posteriormente la muestra se centrifugó a 8000 rpm por 10 minutos a 4°C se descartó el sobrenadante y se resuspendió la fracción de retículo endoplasmático en líquido de extracción.

Para la determinación del porcentaje de retículo endoplasmático recuperado se utilizó la medida de la actividad NADPH-citocromo C reductasa, actividad enzimática específica para este organelo. Para ello se utilizó un producto comercial Sigma® (cytochrome C reductase NADPH Assay Kit). Se preparó una solución de trabajo disolviendo 9 mg de citocromo C en 20 mL de 300 mM de buffer fosfato de potasio, pH 7,8, conteniendo 0,1 mM EDTA). Se colocaron 950 µL de la solución de trabajo (a 25°C) en una cubeta de 1 mL y se añadieron 50 µL de la muestra, se mezcló por inversión y se comenzó la reacción por adición de 100 µL de solución NADPH (solución stock 40 mg/mL, 25 mg de NADPH en 0,625 mL de agua milQ). Se midió en un espectrofotómetro Beckman DU 640 a una absorbancia de 550 nm cada 30 segundos por 5 minutos. La actividad NADPH-citocromo C reductasa fue expresada como porcentaje de la actividad del homogeneizado total.



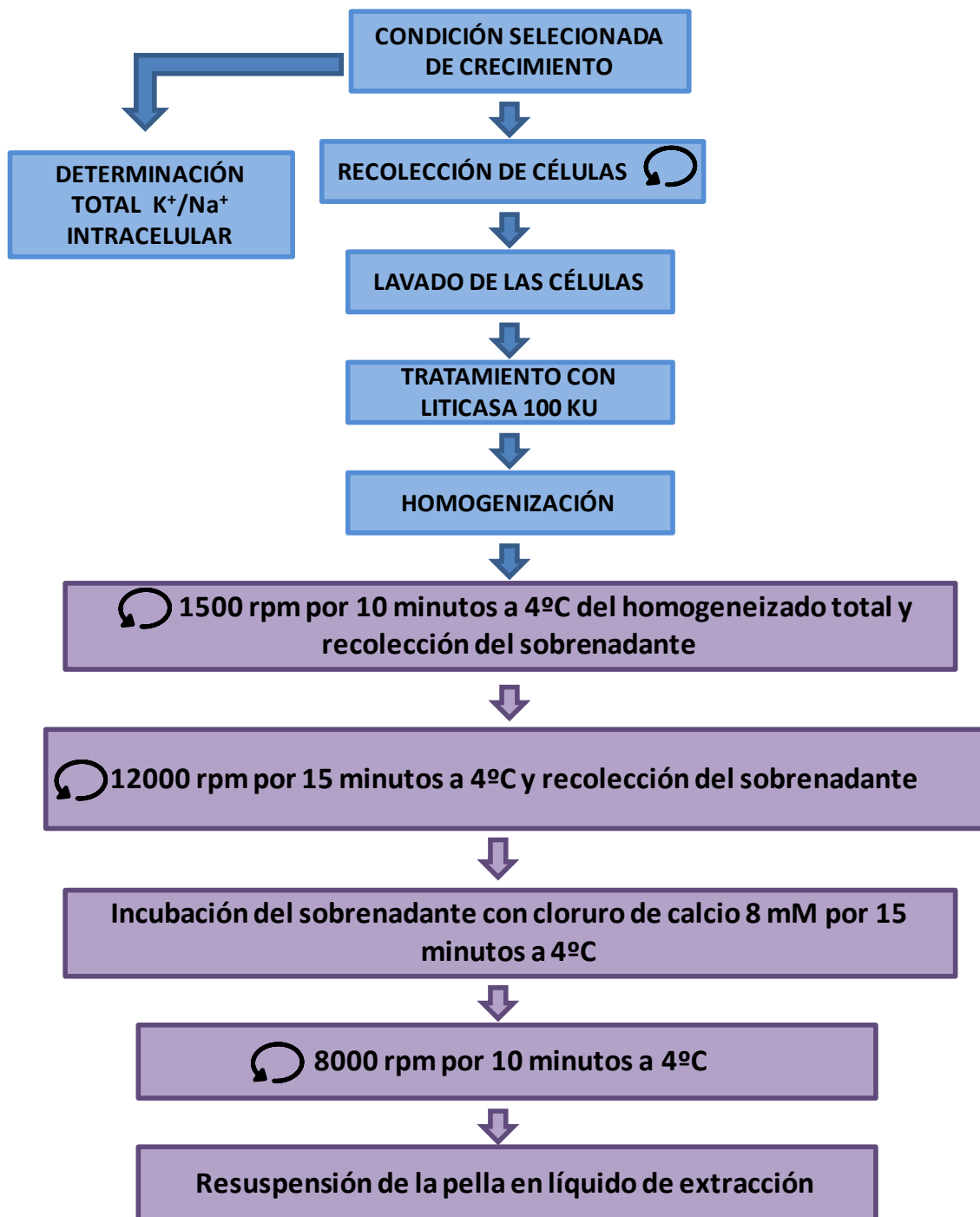


Figura 9. Esquema del método de aislamiento de retículo endoplasmático.  corresponde a una centrifugación.

#### 4.5. Aislamiento de aparato de Golgi.

El aislamiento de la fracción del aparato de Golgi se basó en el método descrito por Antebi y Fink, 1992, con algunas modificaciones menores (Figura 10). Los esferoplastos fueron homogeneizados y centrifugados y la fracción post mitocondrial se obtuvo siguiendo el procedimiento previamente descrito en el apartado de aislamiento de la fracción de retículo endoplasmático. Un mililitro de la fracción post mitocondrial se aplicó en la parte superior de un gradiente de sacarosa conteniendo las siguientes concentraciones de sacarosa: 26, 30, 34, 38, 42, 46, 50 y 54% p/v, (previamente preparado en 10 mM de HEPES, pH 7,5; 1 mM  $MgCl_2$  e inhibidores de proteasas), siendo la capa más concentrada la depositada en el fondo de la columna. El gradiente se dejó 12 horas a 4°C antes de su utilización. Una vez depositada la muestra de fracción post mitocondrial en el gradiente se centrifugó a 40000 rpm por 150 minutos a 4°C. Posteriormente, el gradiente fue fraccionado y se colectaron 12 muestras de aproximadamente 660  $\mu$ L, cada una desde la parte superior del gradiente, para la posterior determinación de cationes. Paralelamente, se determinó la concentración de sacarosa de cada fracción con un refractómetro (Atago corporation), las muestras fueron almacenadas hasta su posterior uso.

Para la determinación del porcentaje de aparato de Golgi recuperado se utilizó la medida de la actividad GDPasa, que fue determinada en cada fracción en buffer conteniendo 0,2 M imidazol, pH 7,5; 10 mM  $CaCl_2$ , 0,1 % Triton-X 100, 2 mM GDP; 100  $\mu$ L de esta solución conteniendo 20  $\mu$ g de proteína, fue incubada a 30°C por 30 minutos. La reacción fue detenida al colocar los tubos en hielo añadiendo 10  $\mu$ L de sulfato dodecil sodio. Para determinar la cantidad de fosfato liberado durante la hidrólisis, 200  $\mu$ L de agua miliQ y 700  $\mu$ L de reactivo de Ames (un a dilución 1:6 de 10% de ácido ascórbico y 0,42% de molibdato de amonio en 1N de ácido sulfúrico) fueron añadidos a cada tubo, y luego se incubaron a 45°C por 20 minutos, la absorbancia fue medida a 660 nm en un espectrofotómetro Beckman DU 640 (Herrero *et al.*, 2002). La actividad GDPasa en la fracción de aparato de Golgi fue expresada como porcentaje de la actividad del homogenado total.

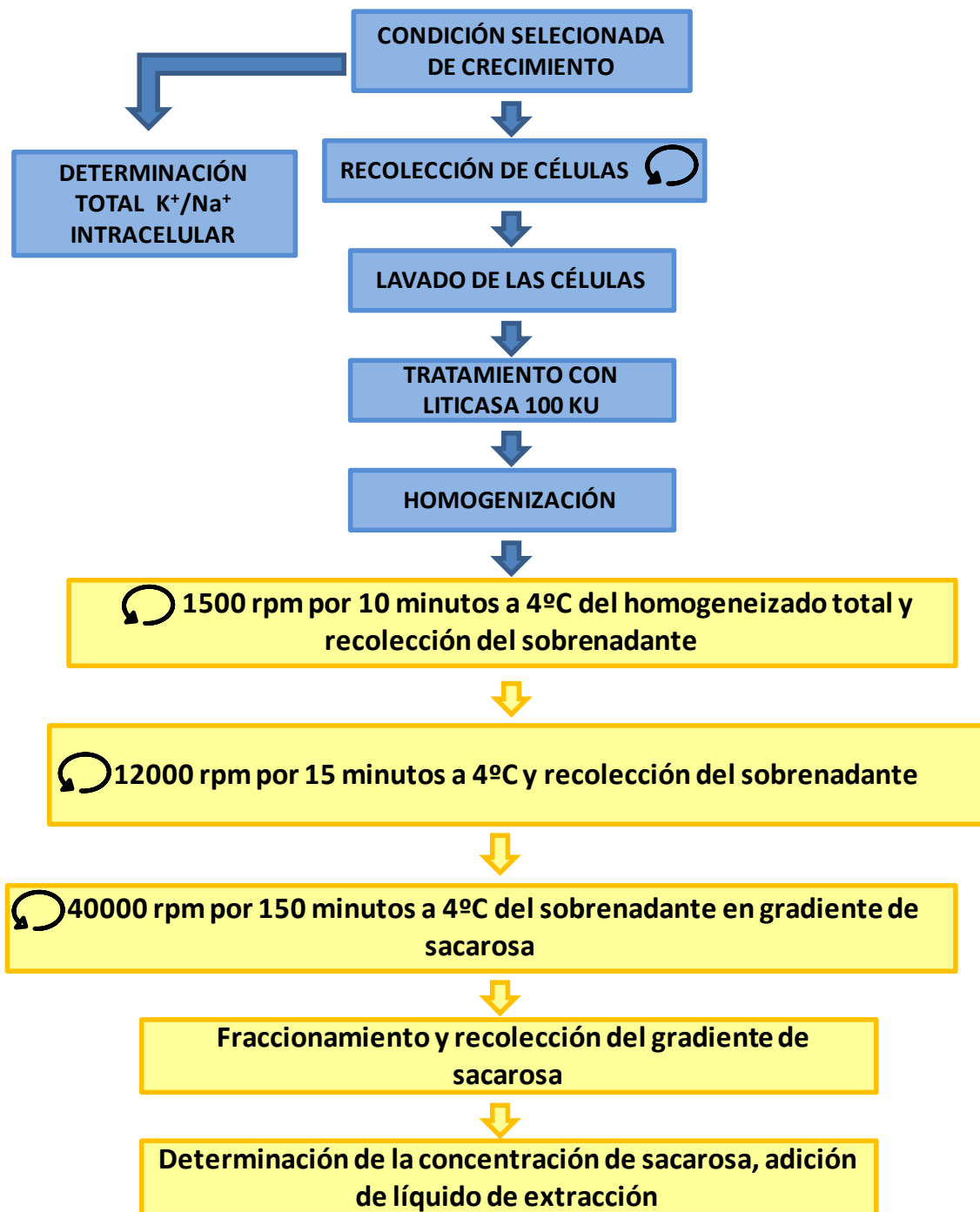



Figura 10. Esquema del método de aislamiento de aparato de Golgi.  corresponde a una centrifugación.

#### 4.6. Aislamiento de la fracción citosólica.

Para la obtención de la fracción citosólica, los esferoplastos fueron homogeneizados, centrifugados y la fracción post mitocondrial se obtuvo siguiendo el

procedimiento previamente descrito en el apartado de aislamiento de la fracción de retículo endoplasmático (Figura 11). La fracción post mitocondrial fue centrifugada a 35000 rpm por 60 minutos a 4°C. Seguidamente el sobrenadante se centrifugó a 54000 rpm por 150 minutos a 4°C. El sobrenadante obtenido correspondía a la fracción citosólica (Daum y Paltauf, 1984).

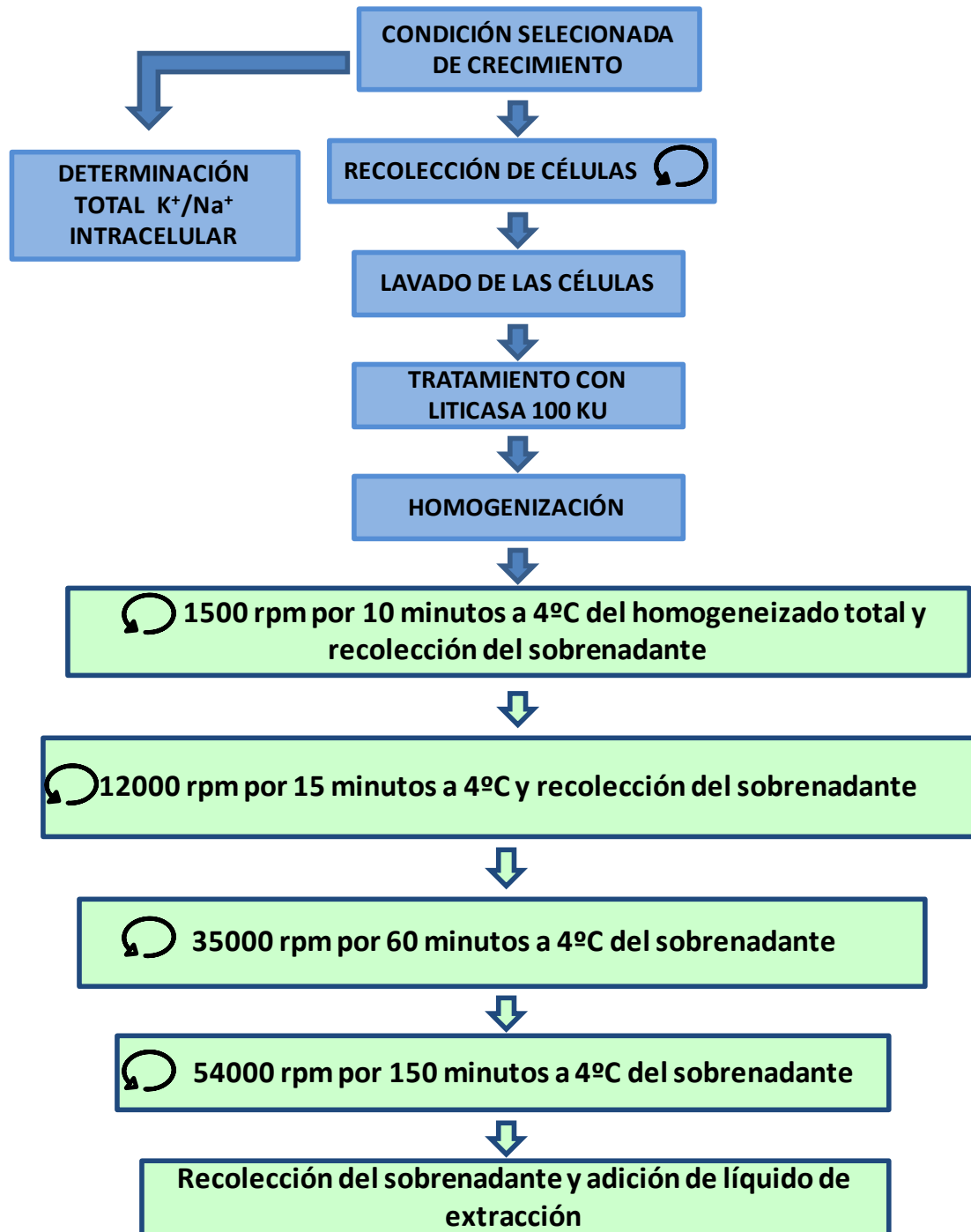



Figura 11. Esquema del método de aislamiento de fracción citosólica.  corresponde a una centrifugación.

## **5. Controles de contaminación cruzada.**

La contaminación de vacuolas en la fracción nuclear, mitocondrial y retículo endoplasmático fue determinada mediante fluorimetría midiendo la actividad V-ATPasa (Ohsumi y Ankaru, 1981; Martínez-Muñoz y Peña, 2005; Cagnac *et al.*, 2007) con algunas modificaciones menores. La contaminación cruzada por núcleos en la fracción vacuolar y mitocondrial fue estimada utilizando microscopía de fluorescencia (Prescott-Breed 1910; Hames y Higgins, 1985)) y espectrofotométricamente al determinar la presencia de ácidos nucleicos en la fracción vacuolar, mitocondrial y retículo endoplasmático de acuerdo a la recomendación de Zhang y Reese (2006). En cuanto al grado de contaminación mitocondrial en la fracción vacuolar, nuclear y retículo endoplasmático, éste fue determinado espectrofotométricamente mediante la actividad citocromo C oxidasa (Yonetani, 1965; Trounce *et al.*, 1996). La contaminación por aparato de Golgi fue determinada espectrofotométricamente midiendo la actividad GDPasa en la fracción vacuolar, mitocondrial, nuclear y retículo endoplasmático.

## **6. Determinación de la concentración de proteínas.**


La concentración de proteína se determinó según el método de Bradford (Bradford, 1976). Este método se basa en la reacción entre los grupos sulfonados ácidos presentes en el Azul de Coomassie (Brilliant blue G-250), por fuerza iónica, con grupos amino libres presentes en los aminoácidos básicos de las proteínas (arginina, lisina e histidina). Los cambios de absorbancia a 595 nm serán directamente proporcionales a la concentración de proteína presente, la cual será calculada posteriormente utilizando una recta patrón. Para la elaboración de la recta patrón se utilizó una disolución de BSA de concentración conocida (2,5 mg/mL) de la que se realizaron diluciones entre 0,75 y 25 g/mL. La reacción colorimétrica se llevó a cabo añadiendo reactivo de Bradford comercial (BioRad) sobre las disoluciones de BSA (albúmina de suero bovino) y sobre las muestras problema. Tras 15 minutos de incubación en oscuridad se midió la absorbancia a 595 nm.

## **7. Permeabilización de la membrana plasmática con citocromo C.**

En el ensayo de permeabilización de la membrana plasmática de las levaduras, se utilizó el procedimiento descrito por Okorokov, 1980, con ligeras modificaciones (Figura12). Se estudiaron tres condiciones: crecimiento en medio YPD con y sin sodio (0,8 M NaCl) y, ayuno de potasio (4 horas) en medio YNB-Formedium®. Se ajustó la

densidad óptica hasta que las células estuvieron en fase logarítmica (0,3-0,4) y se midió la densidad óptica a 600 nm en un espectrofotómetro Beckman DU 640. Luego las células se centrifugaron a 6000 rpm por 5 minutos a 4°C y se lavaron con 1 mL de buffer C1 (0,9 M manitol, 1 mM HEPES, 5 mM MgSO<sub>4</sub> y 1 mM CaCl<sub>2</sub>) para eliminar los restos celulares. Todo esto a 4°C. Se resuspendieron en 100 µL de buffer C2 (2% citocromo C, 18 µg/mL antimicina A, 1mM HEPES, 5 mM MgSO<sub>4</sub>, 1 mM CaCl<sub>2</sub>. H<sub>2</sub>O, 5 mM 2 deoxi-D-glucosa), se incubaron durante 10 minutos a temperatura ambiente. Luego se centrifugó a 10000 rpm por 5 minutos a 4°C y se dieron tres lavados con 1 mL de buffer C3 (0,9 M manitol, 18 µg/mL antimicina A, 5 mM 2 deoxi-D-glucosa, 1mM HEPES, 5 mM MgSO<sub>4</sub>, 1 mM CaCl<sub>2</sub>. H<sub>2</sub>O), se recogieron los sobrenadantes que correspondían con los citoplasmas celulares para luego determinar la cantidad de potasio y sodio. Seguidamente, los restos celulares (pella) obtenidos de los lavados anteriores se resuspendieron en 5 mL de agua miliQ y se dejaron por 10 minutos a temperatura ambiente, se centrifugó a 5000 rpm por 5 minutos a temperatura ambiente y tras un nuevo lavado se recogió el sobrenadante, que luego se analizó para determinar la cantidad de estos cationes en la vacuola. Para determinar las células que no se vieron afectadas por el tratamiento, verificando la efectividad de éste, se realizó un último lavado con buffer líquido de extracción.



Figura 12. Esquema del método de extracción diferencial de iones de potasio y sodio de la vacuola y citoplasma  corresponde a una centrifugación.

## **8. Análisis de contenido interno de potasio y sodio.**

Para estimar el contenido interno de potasio y sodio, se tomaron muestras de levaduras de 1-5 mL que fueron filtradas usando (filtros Millipore AAWP, 0,8 mm de diámetro), éstos se lavaron con 10 mL de una solución 20 mM MgCl<sub>2</sub>. Un segundo lavado se llevó a cabo por arrastre y resuspensión de las células sobre otro filtro, para el caso de las levaduras que se incubaron a concentraciones de cationes superiores a 0,5 mM. El contenido celular se obtuvo mediante lisis ácida con 5 mL de una solución de HCl 0,2 M y MgCl<sub>2</sub> 10 mM durante 12-24 horas (Ramos *et al.*, 1990). Seguidamente se centrifugaron las muestras para separar los restos celulares a 5000 rpm por 2 minutos a temperatura ambiente. Las concentraciones de potasio y sodio presentes en el sobrenadante se midieron en un espectrofotómetro de absorción atómica (SpectrAA-240FS, Varian) y el contenido se expresó en nanomoles del catión por miligramo de peso seco de células.

El contenido de potasio y sodio en las fracciones vacuolares, de retículo endoplasmático, de aparato de Golgi, mitocondriales, citosólicas y nucleares, se obtuvo mediante lisis ácida con 5 mL de una solución de HCl 0,2 M y MgCl<sub>2</sub> 10 mM durante 12-24 horas y el contenido fue determinado igualmente mediante espectrofotometría de absorción atómica (SpectrAA-240FS, Varian).

## **9. Determinación de los flujos de potasio.**

En estos ensayos las levaduras crecieron en medio YNB-F suplementado con 100 mM de KCl hasta alcanzar un densidad óptica entre 0,3-0,4 (DO<sub>600</sub>), se lavaron con agua miliQ a 4°C, se centrifugaron a 4500 rpm por 5 minutos a 4°C y se resuspendieron en medio YNB-Formedium® con diferentes concentraciones de potasio. Tomándose muestras a determinados tiempos para luego determinar el contenido intracelular de potasio siguiendo los pasos que se detallan en el apartado anterior (8).

## **10. Determinación del volumen celular.**

Para la obtención de las medidas del volumen celular en levaduras, las células fueron cultivadas en medio YNB-Formedium a una concentración de 100 mM de KCl a 28°C y 200 rpm en matraces de 250 mL. Se ajustó la densidad óptica hasta que las células estuvieron en fase logarítmica, luego se centrifugaron a 5500 rpm, lavaron con agua miliQ

a 4°C y se resuspendieron en medio YNB-Formedium. Las muestras se tomaron a tiempo cero y a las 4 horas. Se partió de una cantidad inicial de  $1,0 \times 10^8$  células por mililitro.

El volumen celular (VCM) se determinó en un aparato Z2 Coulter® Particle Count and Size Analyzer (Beckman Coulter) y se expresó en femtolitros (fL). Este nos indica el tamaño de las células contadas y representa el tamaño o volumen individual de las células. Este método cuenta y mide los cambios en la resistencia eléctrica, a medida que las células suspendidas en un líquido conductivo (isotón), pasan a través de una abertura y al hacerlo actúan aisladores eléctricos. En el análisis de los resultados se utilizó el programa COULTER AccuComp 3,01 de Beckman -Coulter.

### **11. Microscopía de Fluorescencia.**

Para los análisis de fluorescencia, las cepas se cultivaron en medio YNB-Formedium® suplementado con 50mM de KCl durante toda la noche y se recogieron en fase logarítmica. Se resuspendió  $1,0 \times 10^6$  células por mililitro en 10 mM de buffer HEPES pH 7,4 suplementado con 5% de glucosa. Posteriormente, a una solución stock de 10mM de DMSO, se añadió CellTracker Blue CMAC y C-MAC Arg (Invitrogen®) a una concentración final de 100  $\mu$ M. Las células se incubaron a temperatura ambiente con estos marcadores del lumen de la vacuola por 25 minutos. Luego se visualizaron las células utilizando un microscopio de fluorescencia Leica DMR a un aumento de 100X con objetivo de inmersión y utilizando aceite de inmersión (Sigma). Las imágenes fueron fotografiadas con una cámara Leica DC 500, utilizando el programa fotográfico Leica IM50 4,0 y tratadas con el programa Image J Java.

### **12. Diseño experimental y estadístico.**

Todos los experimentos realizados en este trabajo se hicieron por triplicado y en los considerados válidos, el error estándar fue menor al 10%. Los datos de tamaño celular y vacuolar fueron analizados mediante ANOVA (Test de Fisher).

### **13. Procedimientos informáticos y bases de datos.**

En el análisis del volumen celular se utilizó el programa COULTER AccuComp 3,01 de Beckman-Coulter. En el análisis estadístico de los experimentos de microscopía de fluorescencia se utilizaron los programas Image J e Info-Gen®.



En las búsquedas bibliográficas se utilizaron las bases de datos PubMed® y MEDLINE®. A partir de la página web (<http://www.yeastgenome.org/>) se obtuvo información genética y bioquímica de las levaduras estudiadas en este trabajo.

## RESULTADOS

### 1. Distribución intracelular de cationes.

#### 1.1. Eficiencia del procedimiento de aislamiento de organelos.

Para el aislamiento de las distintas fracciones subcelulares obtenidas en esta investigación, se desarrolló el siguiente esquema general de trabajo, que aparece más detallado en la sección de Materiales y Métodos. El tiempo de ejecución fue de aproximadamente cuatro horas. La Figura 13 esquematiza el procedimiento desarrollado, así como los experimentos realizados para determinar la pureza de las diferentes fracciones (vacuolar, mitocondrial, nuclear, retículo endoplasmático, aparato de Golgi y citosólica).

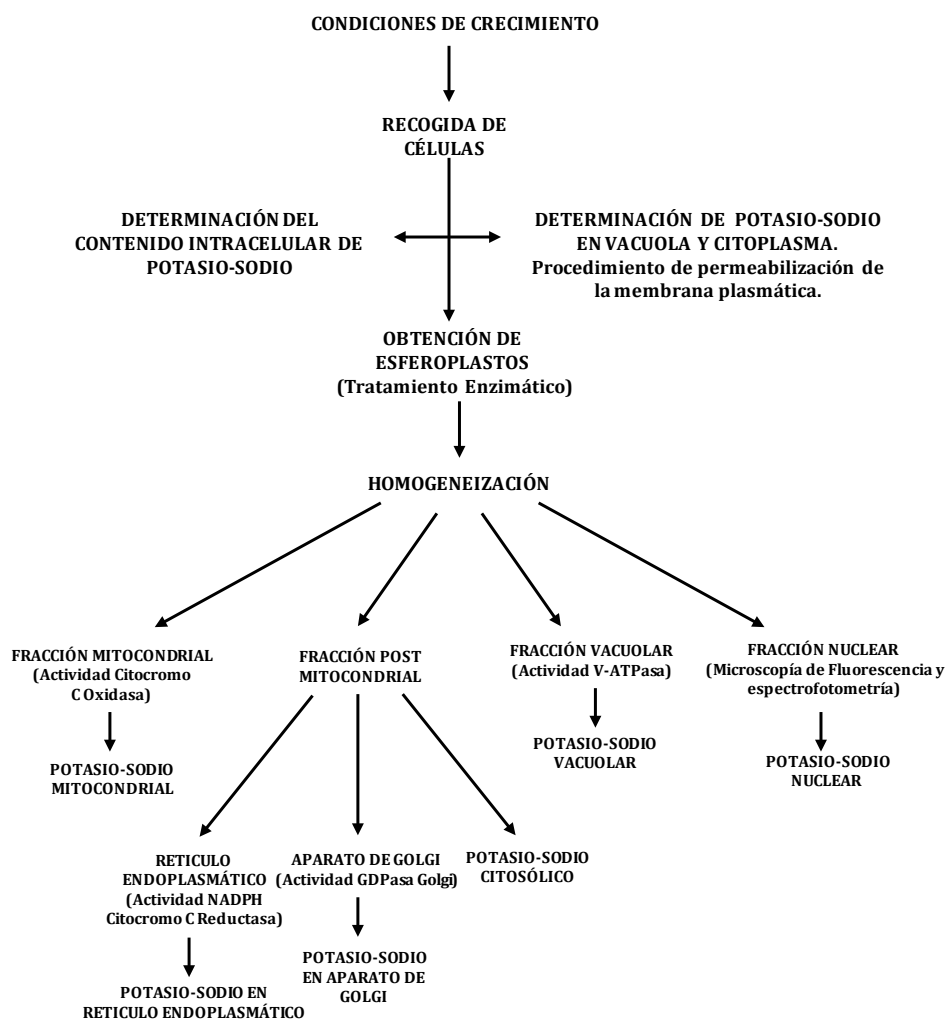


Figura 13. Flujograma general para la determinación de la distribución intracelular de cationes. Todas las centrifugaciones se llevaron a cabo a 4°C.

Con el objetivo de validar nuestros resultados, se puso especial cuidado en el proceso de homogeneización llevado a cabo. Luego del mismo, organelos como el núcleo, mitocondria y vacuola permanecieron intactos. El aparato de Golgi y el retículo endoplasmático formaron vesículas de tamaño homogéneo. El homogeneizado fue seguido mediante microscopía para determinar el número de esferoplastos obtenidos mediante la digestión con liticasa 100 KU, determinándose la efectividad de la concentración de enzima utilizada, así como las células que permanecieron intactas, también fue observado la presencia de núcleos intactos y la ausencia de agregados citoplasmáticos. En este sentido la calidad del homogeneizado fue importante para los ensayos con los distintos marcadores enzimáticos, pues la recuperación de las actividades enzimáticas es un indicador de la calidad del procedimiento usado. Para obtener condiciones reproducibles de homogeneización, las condiciones de crecimiento de las células fueron estandarizadas.

Las levaduras cultivadas bajo las distintas condiciones de crecimiento fueron tratadas como se describe en el apartado de materiales y métodos, para determinar posteriormente la distribución intracelular de cationes, la eficiencia de los procedimientos de aislamiento y las contaminaciones cruzadas entre las distintas fracciones de organelos aislados. Después de seguir los distintos procedimientos para el aislamiento de organelos, se determinó su eficiencia en función del porcentaje de actividad enzimática recuperada en cada fracción aislada en relación con el homogeneizado total como se presenta en la siguiente tabla.

**Tabla 3. Porcentajes de eficiencia de aislamiento de organelos.** Los datos son la media de tres experimentos.

<b>Organelo Aislado</b>	<b>Determinación de Pureza</b>	<b>Porcentaje de Recuperación</b>
<b>Núcleo</b>	<b>Microscopía de fluorescencia- Espectrotometría</b>	<b>91 ± 8</b>
<b>Vacuola</b>	<b>VATPasa</b>	<b>40 ± 8</b>
<b>Mitocondria</b>	<b>Citocromo C oxidasa</b>	<b>27 ± 3</b>
<b>Retículo Endoplasmático</b>	<b>Citocromo C reductasa</b>	<b>71 ± 6</b>
<b>Aparato de Golgi</b>	<b>GDPasa</b>	<b>87 ± 3</b>

Estos porcentajes son comparables a los que se han previamente descrito en la literatura, cuando estos organelos fueron aislados para diferentes propósitos (De Pierre y Dalner 1975; Lang *et al* 1977; Schenkman y Cinti, 1978; Zuily-Fodil *et al* 1978; Kringstad *et al* 1980; Rott y Nelson 1981; Yanagisawa *et al* 1990; González-Barroso *et al* 2006). Además, nuestros controles para determinar las posibles contaminaciones cruzadas sugieren que las mitocondrias, vacuolas, aparato de Golgi o el retículo endoplasmático contaminaron otras fracciones de organelos en porcentajes menores al 5%. Debido al procedimiento de aislamiento seguido, la fracción del aparato de Golgi estuvo prácticamente libre de otros organelos (Antebi y Fink, 1992). Las fracciones vacuolar, de retículo endoplasmático y mitocondrial estuvieron virtualmente libres de contaminación por núcleos, es decir no se detectaron núcleos por microscopía de fluorescencia y en la lectura espectrofotométrica de ácidos nucleicos, los valores obtenidos fueron de aproximadamente 0,001 por gramo de célula en relación al control de 0,2 (Zhang y Reese, 2006). Estos resultados indican un grado bajo de contaminación cruzada en los diferentes procedimientos de fraccionamiento utilizados en este estudio. Por ejemplo, en el caso de la fracción nuclear aislada en células cultivadas en 50 mM de KCl para la cepa silvestre, la contaminación vacuolar fue de un 4% y la contaminación mitocondrial de un 3%, mientras que la contaminación por retículo endoplasmático y aparato de Golgi fue incluso inferior al 1%. En el caso de la vacuola, la contaminación por mitocondrias fue de un 4%, no se detectó contaminación por núcleos, y la contaminación por retículo endoplasmático y aparato de Golgi fue de 2,5%.

## **1.2. Distribución intracelular de potasio.**

La distribución intracelular de cationes fue estudiada en la cepa silvestre BY4741 de *S. cerevisiae* y mutantes vacuolares seleccionados. De esta manera, además de analizar la localización subcelular de cationes en una cepa control, también se buscó analizar un grupo de mutantes diferentes, afectados en la fisiología de la vacuola (Tabla 4).

Tabla 4. Cepas utilizadas para el estudio de la distribución intracelular de cationes.

Cepas	Genotipo	Función Génica
BY4741	<i>MATa his3Δ1 leuΔ0 met15Δ0 ura3Δ0</i>	
$\Delta ptc1$	<i>ptc1::NAT1</i>	Fosfatasa tipo PP2C
$\Delta vam6$	<i>vam6::kan MX4</i>	Proteína de morfogénesis vacuolar
$\Delta vnx1$	<i>vnx1::LEU2</i>	Antiporte Vacuolar Na <sup>+</sup> (K <sup>+</sup> )/H <sup>+</sup>
$\Delta nhx1$	<i>nhx1::LEU2</i>	Antiporte Prevacuolar-vacuolar Na <sup>+</sup> (K <sup>+</sup> )/H <sup>+</sup>

Se seleccionaron por una parte dos mutantes que carecían de un transportador vacuolar de cationes como *vnx1* y *nhx1*, para determinar si los posibles cambios observados fueron debido a la actividad de transporte iónico de estas proteínas. Por otra parte, se incluyeron otros dos mutantes, *ptc1* y *vam6*, con defectos generales en la morfología y fisiología vacuolar. Estos dos últimos mutantes también presentan alteraciones en la morfología vacuolar, aunque no se espera que tengan afectado *per se* el transporte de iones a pesar de que se ha publicado su sensibilidad a sodio y litio (Price *et al.*, 2000; Bonangelino *et al.*, 2002, Ariño *et al.*, 2011). En la Figura 14 se presentan la cepa silvestre (wt) y los mutantes vacuolares estudiados en 50 mM de KCl.

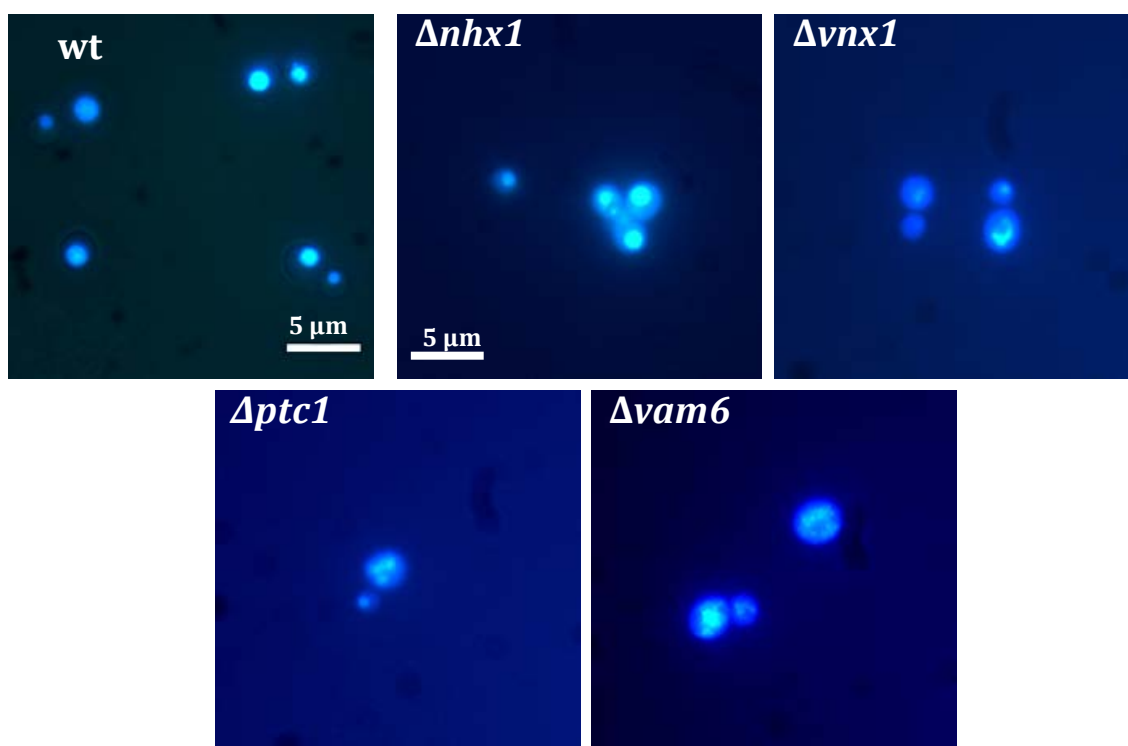
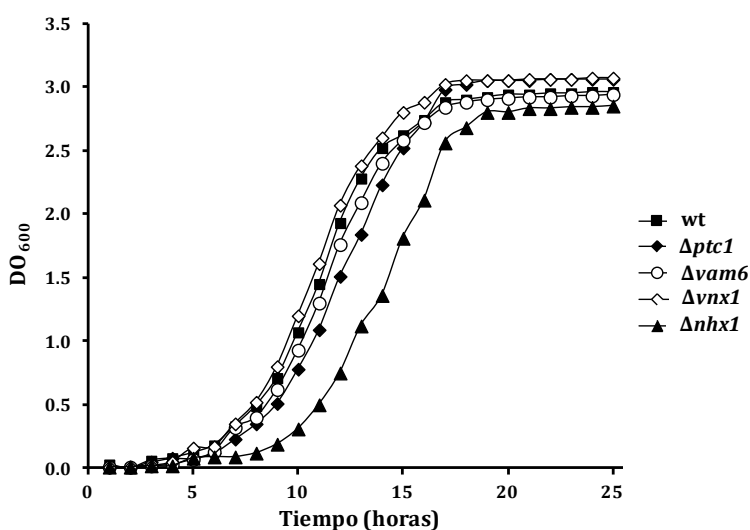


Figura 14. La cepa silvestre (wt) y mutantes vacuolares observados mediante microscopía de fluorescencia cultivados en 50 mM de KCl. Las levaduras fueron teñidas con los compuestos fluoróforos (CellTracker Blue CMAC y C-MAC Arg, Invitrogen®) (aumento 100 X). Puede observarse las vacuolas anormales en  $\Delta ptc1$  y  $\Delta vam6$ .

Como un paso previo al estudio de la distribución intracelular de potasio se realizó un ensayo de crecimiento en medio líquido. Se pudo observar al seguir la curva de crecimiento (Figura 15) que en un medio rico, sin limitaciones de potasio (YPD), todas las cepas estudiadas crecieron de manera similar y aunque los mutantes *nhx1*, que carecen del antiporte  $K^+(Na^+)/H^+$  localizado en las membranas prevacuolar y vacuolar (Brett *et al.*, 2005; Qiu y Fratti 2010; Hernández *et al.*, 2009), mostraron un crecimiento ligeramente menor, tanto la tasa de crecimiento como el rendimiento de biomasa fueron similares a los obtenidos para la cepa silvestre y los mutantes *vam6*, *ptc1* y *vnx1* (que carece del transportador vacuolar  $K^+(Na^+)/H^+$ , Cagnac *et al.*, 2007). Más concretamente, pudo observarse que en la cepa silvestre la tasa de crecimiento ( $\ln 2/\text{Tiempo de duplicación en horas}$ ) fue de  $0,34 \text{ h}^{-1}$  y los mutantes  $\Delta ptc1$ ,  $\Delta vam6$ ,  $\Delta vnx1$  fue de 0,27, 0,28 y 0,28 respectivamente; mientras que en el mutante  $\Delta nhx1$  fue 0,20.



**Figura 15. Ensayos de crecimiento en medio YPD.** Las cepas indicadas se crecieron en medio YPD durante 30 horas a  $28^{\circ}\text{C}$  y se midió la densidad óptica ( $\text{DO}_{600}$ ) cada hora.

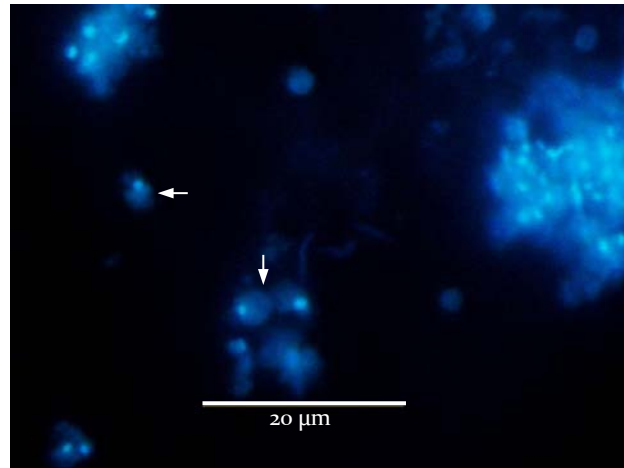
Bajo estas condiciones de crecimiento, el contenido total intracelular de potasio fue comparable en todas las cepas, aunque es importante resaltar que el mutante *vam6*, acumuló aproximadamente un 20% más de potasio que la cepa silvestre con diferencias altamente significativas (Test de Tukey,  $P < 0,001$ ) (Tabla 5).

**Tabla 5. Contenido total de potasio en condiciones no limitantes y de ayuno de potasio.** Las células se cultivaron en YPD (1) o en YNB-F suplementado con 50 mM KCl y ayunadas durante cuatro horas. (2). Los datos son la media de cinco experimentos y las diferentes letras representan diferencias estadísticamente significativas entre las cepas bajo las mismas condiciones (Test de Tukey,  $P < 0,05$ ).

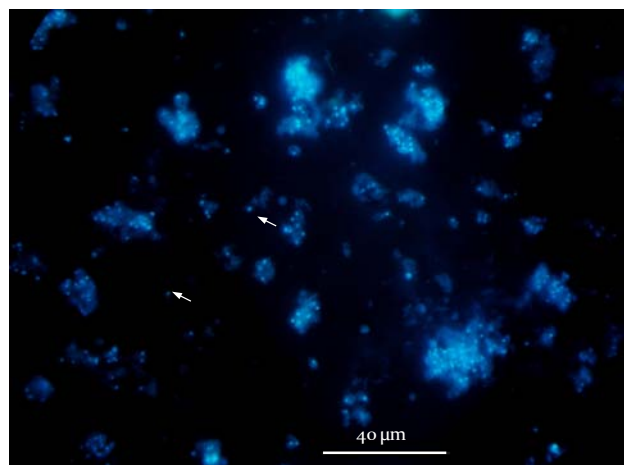
Cepa	Contenido Intracelular Total de Potasio (nmoles·mg células)	
	Potasio no limitante <sup>1</sup>	Ayuno de potasio <sup>2</sup>
<b>BY4741</b>	<b>564 ± 47<sup>b</sup></b>	<b>265 ± 14<sup>c</sup></b>
<b><i>Δptc1</i></b>	<b>558 ± 14<sup>b</sup></b>	<b>237 ± 14<sup>b</sup></b>
<b><i>Δvam6</i></b>	<b>680 ± 40<sup>c*</sup></b>	<b>281 ± 29<sup>c</sup></b>
<b><i>Δvnx1</i></b>	<b>593 ± 40<sup>b</sup></b>	<b>209 ± 23<sup>a</sup></b>
<b><i>Δnhx1</i></b>	<b>508 ± 25<sup>a</sup></b>	<b>202 ± 18<sup>a</sup></b>

\*Denota diferencias altamente significativas mediante el Test de Tukey ( $P < 0,001$ ).

En la determinación de la distribución de potasio en condiciones no limitantes del catión (medio YPD), los resultados mostraron que en la cepa silvestre, la vacuola fue el organelo celular con mayor contenido de potasio (alrededor de un 45% del total porcentual). También es interesante resaltar que el núcleo (Figura 16 y Figura 17) contenía un 29% del total de potasio, mientras que pequeñas cantidades de este catión estuvieron presentes en la mitocondria, aparato de Golgi y retículo endoplasmático (Figura 18). Finalmente, es importante mencionar que en experimentos control destinados a comparar el comportamiento de la cepa silvestre cuando creció en medio complejo YPD o en medio sintético YNB-F suplementado con 50 mM KCl, se observó que las tasas de crecimiento fueron comparables en ambos medios (0,34 y 0,33 h<sup>-1</sup>, respectivamente) (Figura 15 y Navarrete *et al.*, 2010), así como también, lo fueron las concentraciones intracelulares de potasio (571±38 y 564±47 nanomoles. mg<sup>-1</sup> de célula, respectivamente) y la distribución intracelular del catión.



**Figura 16. Tinción de esferoplastos con DAPI.** Se muestran los esferoplastos (señalados con flechas) teñidos con DAPI al microscopio de fluorescencia después de la digestión con liticasa 100 KU. Las imágenes fueron adquiridas con una aumento de 40X. La barra de escala equivale a 20 μm.



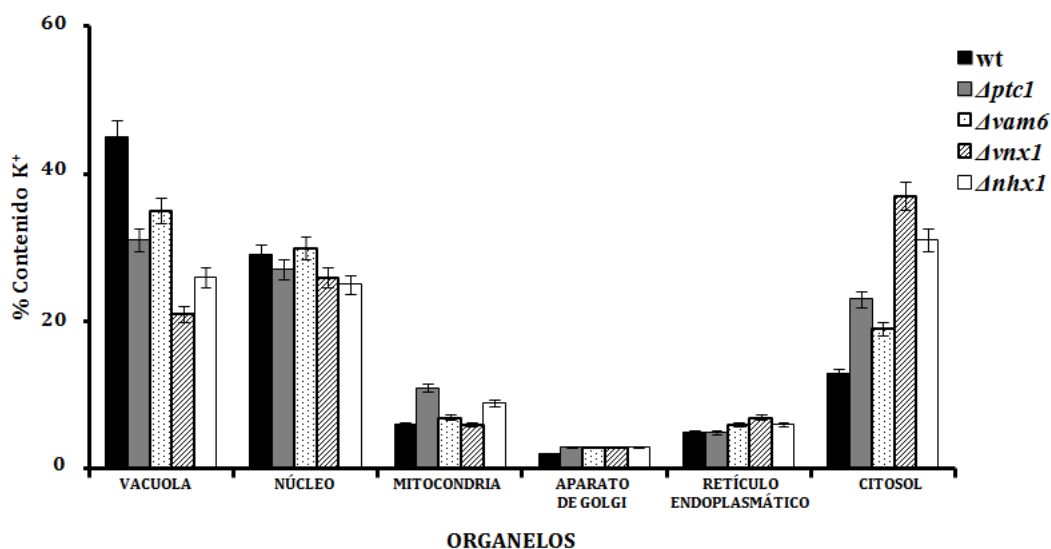
**Figura 17. Tinción de Núcleos con DAPI.** Se muestra la fracción de núcleos aislados al microscopio de fluorescencia teñidos con DAPI (señalados con flechas). Las imágenes fueron adquiridas con una aumento de 40X. La barra de escala equivale a 40 μm.

Se aplicó el mismo procedimiento para el aislamiento de los distintos organelos en los cuatro mutantes vacuolares estudiados en este trabajo. Primeramente, se determinó que las alteraciones en las vacuolas de los distintos mutantes no generaran distintos rendimientos en los diferentes organelos aislados. En general, el rendimiento de proteína total fue de 38-42 mg.g<sup>-1</sup> de célula en todas las cepas, y en todos los casos entre un 15-17% correspondía a proteína vacuolar. El hecho de que por ejemplo, las proteínas del retículo endoplasmático fueran entre 11-13% de la proteína total en todas las cepas, refuerza la idea que los resultados de aislamiento de todos los organelos en todos los mutantes fueron suficientemente similares a la cepa silvestre, asegurando que las comparaciones fueran suficientemente sólidas. Aunque, afectados en diferentes procesos, todos los mutantes mostraron una distribución intracelular de potasio alterada en sentido parecido, con una



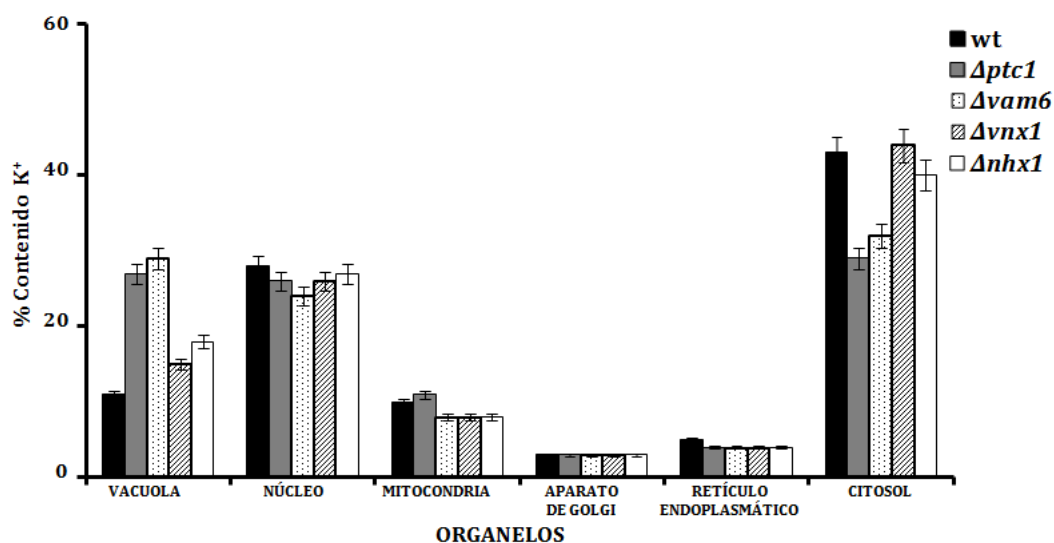
notable disminución de la cantidad de este catión en la vacuola y un incremento del mismo en el citosol. Esta redistribución fue más relevante en el caso de los dos mutantes afectados en los transportadores, los cuales acumularon aun más potasio en el citosol que en la vacuola. Por ejemplo, en el mutante *vx1*, se midió un 37% de potasio interno en el citosol y solamente un 21% localizado en la vacuola, lo que confirma su papel en el intercambio de cationes por protones en el lumen vacuolar (Cagnac *et al.*, 2007). Por otra parte, el potasio presente en el núcleo, mitocondria, aparato de Golgi y retículo endoplasmático no fue significativamente afectado por estas mutaciones, aunque si fue observado un incremento de potasio en la fracción mitocondrial del mutante *ptc1* (Figura 18).

Hay que destacar, que no se observó un incremento en los valores de contaminación cruzada vacuolar en otras fracciones de organelos de estos mutantes, sugiriendo que la integridad de sus vacuolas no fue comprometida durante el proceso de extracción y aislamiento. Por otra parte, se examinaron las vacuolas aisladas de cada uno de estos mutantes mediante microscopía y no se observaron diferencias significativas en la morfología de las vacuolas purificadas, descartándose un artefacto o fragilidad vacuolar.



**Figura 18. Distribución intracelular de potasio en condiciones no limitantes del catión.** El contenido de potasio en las fracciones vacuolares, de retículo endoplasmático, de aparato de Golgi, mitocondriales, citosólicas y nucleares, se obtuvo mediante lisis ácida con 5 mL de una solución de HCl 0,2 M y MgCl<sub>2</sub> 10 mM durante 12-24 horas y el contenido fue determinado igualmente mediante espectrofotometría de absorción atómica (SpectrAA-240FS, Varian). Los valores se presentan en porcentaje. Las barras de error corresponden a la desviación estándar.

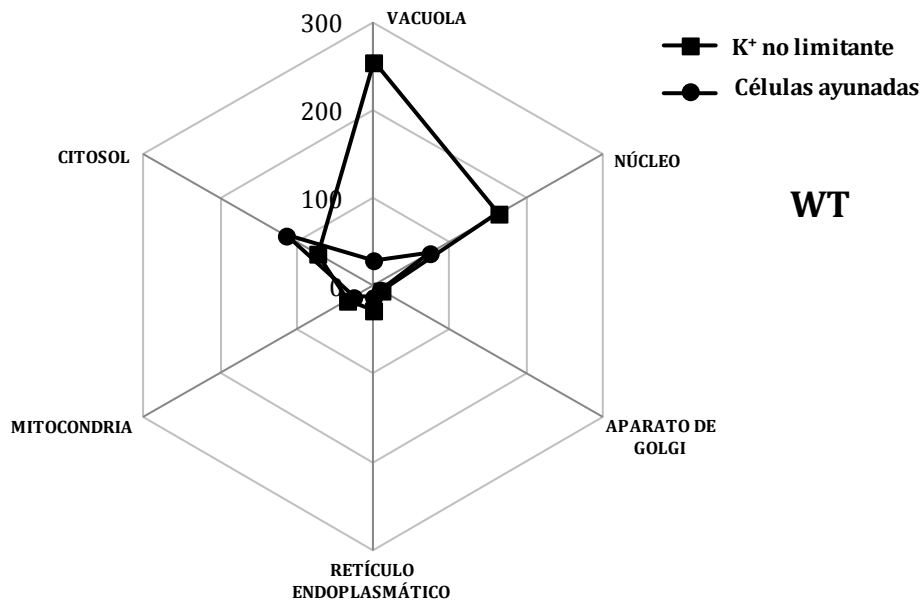
En un experimento posterior, las células fueron sometidas a un ayuno de potasio por cuatro horas. Las células se cultivaron en medio sintético YNB-F suplementado con 50 mM de KCl. Después de cuatro horas de incubación en el mismo medio sin potasio, todas las cepas perdieron más de un 50% de su contenido intracelular de potasio (Tabla 5). La determinación de la distribución intracelular de potasio, reveló que el potasio vacuolar disminuyó espectacularmente en la cepa silvestre y que el porcentaje en el citosol fue 3,3 veces más alto que las células cultivadas en condiciones no limitantes de potasio, lo que significa que se acumularon mayores cantidades de potasio citosólico en las células ayunadas. Por lo tanto, es concebible postular que el potasio sea transportado desde la vacuola al citosol con el objetivo de cumplir con los requerimientos citosólicos del catión. Finalmente, vale la pena mencionar que el núcleo mantuvo un porcentaje similar de potasio después del ayuno (Figura 19).



**Figura 19. Distribución intracelular de potasio en células ayunadas.** Las células fueron ayunadas en medio sintético YNB-F por un período de cuatro horas. El contenido en las fracciones vacuolares, de retículo endoplasmático, de aparato de Golgi, mitocondriales, citosólicas y nucleares, se obtuvo siguiendo el procedimiento empleado en la Figura 18. Los valores se presentan en porcentaje. Las barras de error corresponden a la desviación estándar.

Las gráficas de radar, también conocidas como diagramas de araña, han sido utilizadas para intentar expresar visualmente las distancias entre el comportamiento de la cepa silvestre y sus mutantes isogénicos en condiciones de potasio no limitante y de ayuno, así como observar la superficie generada por distintas variables, en el caso del comportamiento de los distintos organelos estudiados. Los cambios en la distribución vacuolar y citosólica de potasio durante el ayuno de este catión fueron más evidentes en la

cepa silvestre (Figura 20), mientras que fueron mucho menos relevantes en los mutantes que presentan un morfología vacuolar alterada (Figura 21) y los mutantes que carecían de un transportador vacuolar de cationes (Figura 22), debido probablemente a defectos en la fisiología de la vacuola, los cuales provocan una disminución del potasio vacuolar y a su vez, un incremento en las concentraciones de potasio citosólico, después de que las células fueran sometidas al período de ayuno de cuatro horas.



**Figura 20.** Gráfica radar que representa la distribución intracelular de potasio en condiciones no limitantes y de ayuno del catión en la cepa silvestre. Las células en condiciones no limitantes de potasio fueron cultivadas en medio rico (YPD). Las células sometidas a ayuno de potasio fueron previamente cultivadas en medio sintético YNB-F suplementado con 50 mM KCl y luego fueron ayunadas en medio sintético YNB-F libre de potasio por un período de cuatro horas. Estos mutantes fueron tratados como se describe en la Figura 18 para determinar el contenido de cationes. Los valores se presentan en nmoles.mg de célula.

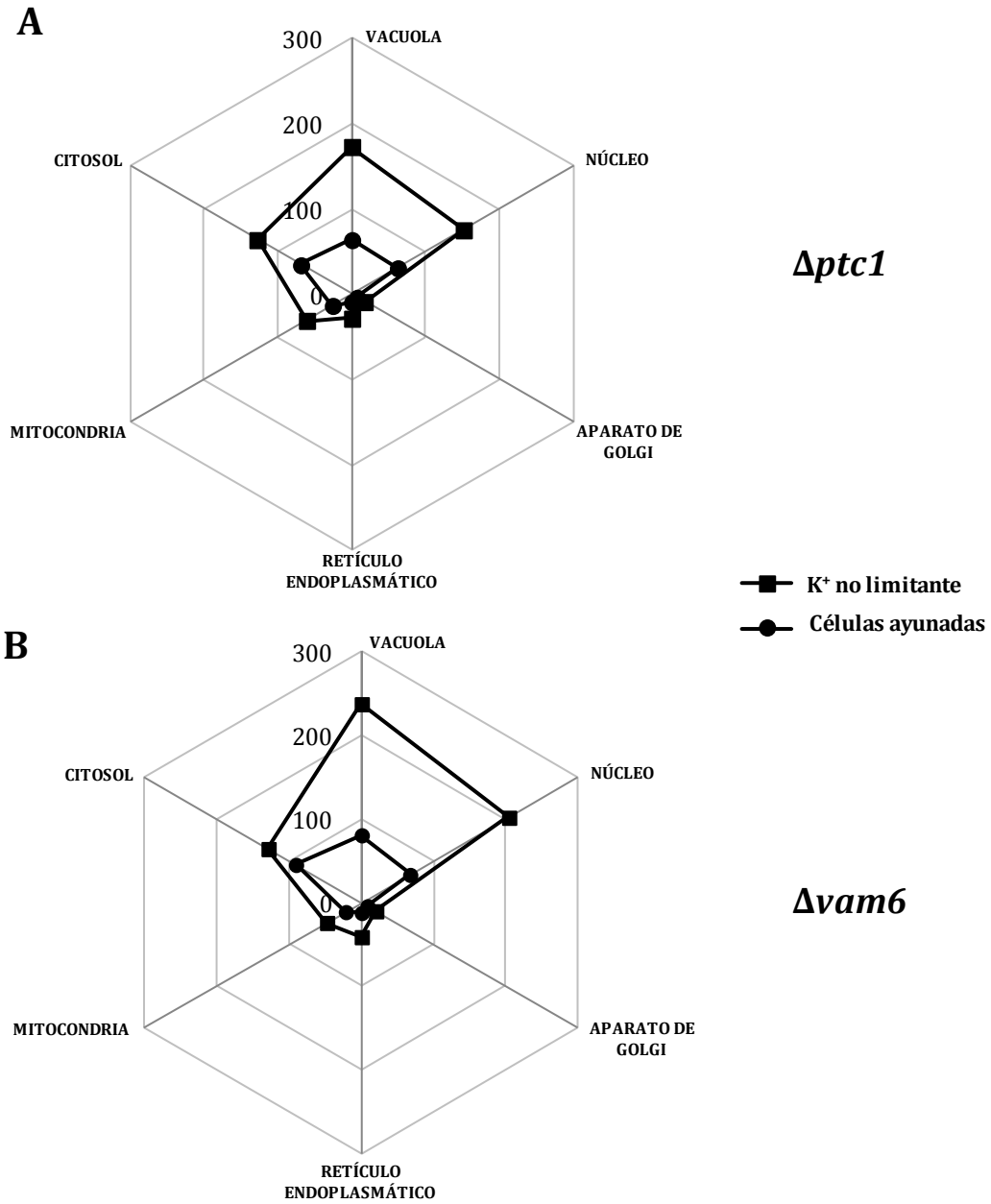
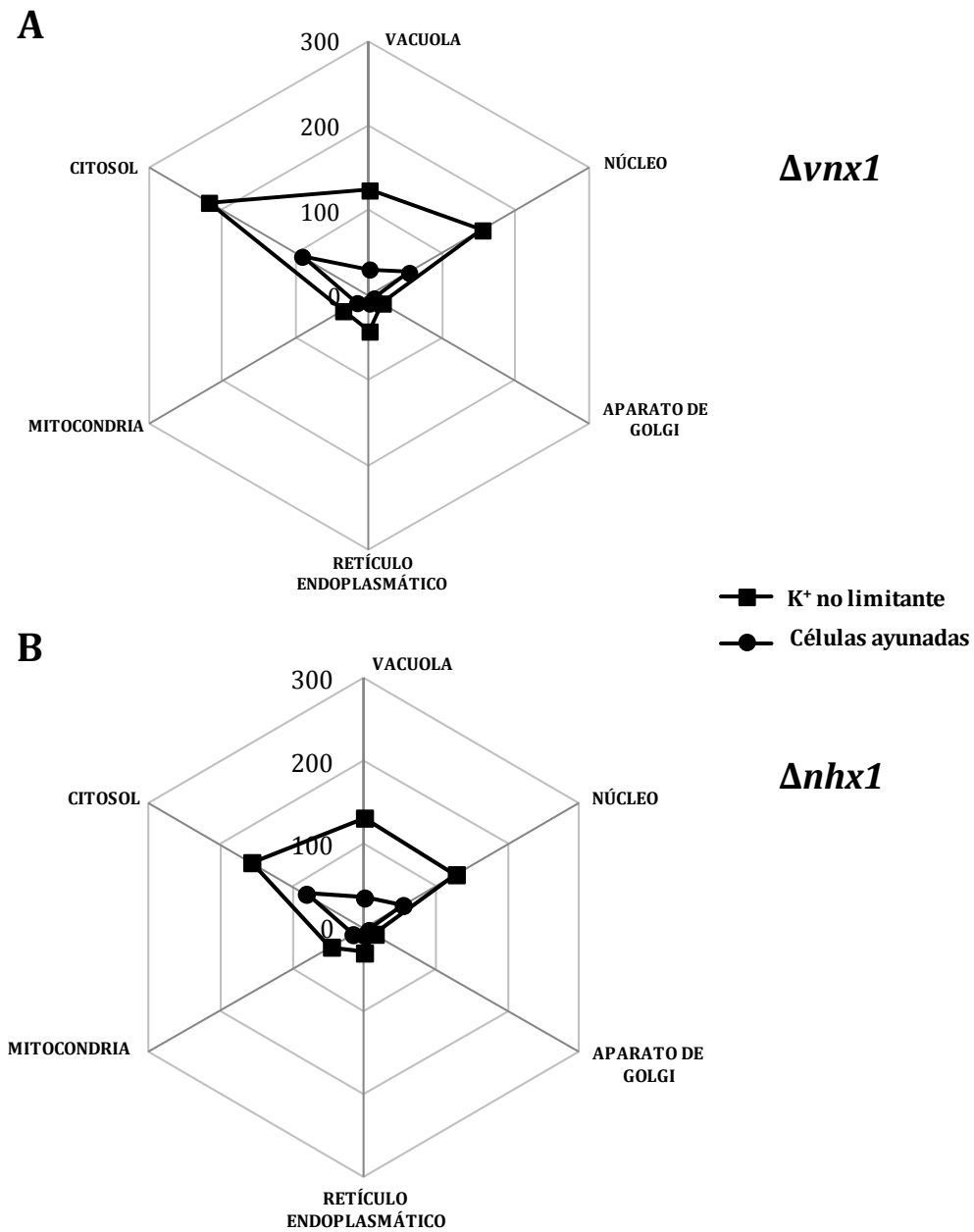


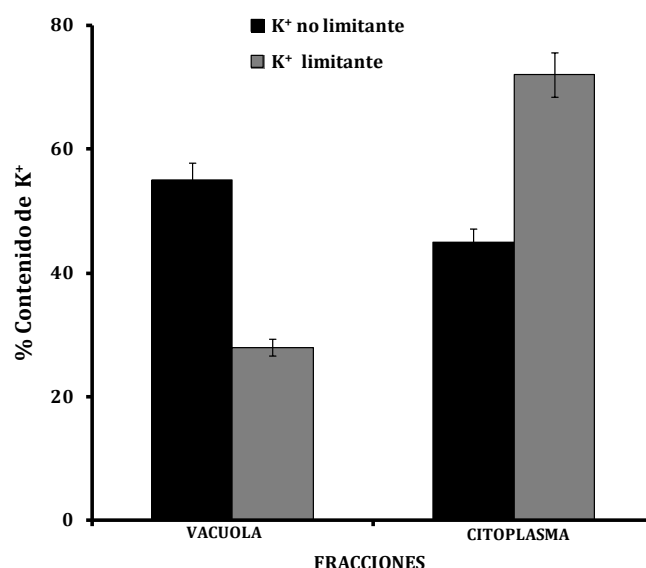
Figura 21. Gráfica radar que representa la distribución intracelular de potasio en condiciones no limitantes y de ayuno del catión en los mutantes que presentan una morfología vacuolar alterada A (*Δptc1*) y B (*Δvam6*). Estos mutantes fueron tratados como se describe en la Figura 18 para determinar el contenido de cationes. Los valores se presentan en nmoles.mg de célula.



**Figura 22.** Gráfica radar que representa la distribución intracelular de potasio en condiciones no limitantes y de ayuno del catión en los mutantes que carecían de un transportador vacuolar de cationes A ( $\Delta vnx1$ ) y B ( $\Delta nhx1$ ). Estos mutantes fueron tratados como se describe en la Figura 18 para determinar el contenido de cationes. Los valores se presentan en nmoles.mg de célula.

En las gráficas de radar se observó similitud entre los dos mutantes afectados en la morfología de la vacuola, así como entre los mutantes que carecían de un transportador vacuolar en cuanto a las superficies generadas.

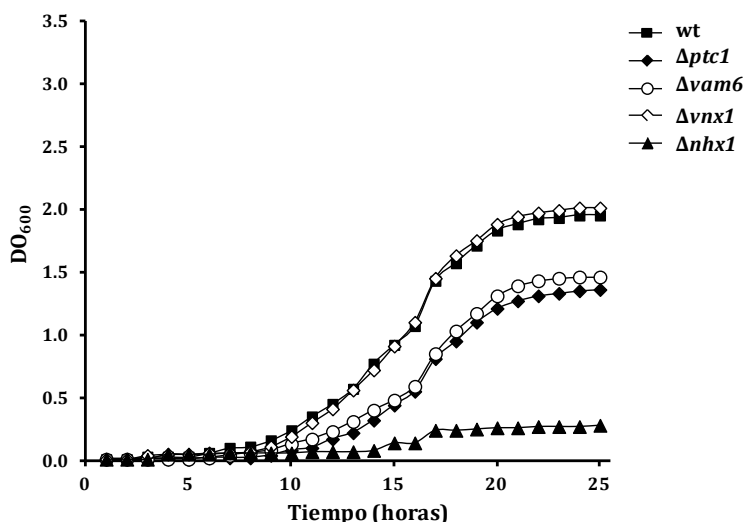
Teniendo en cuenta que el procedimiento más ampliamente utilizado para estudiar la distribución intracelular de cationes (Okorokov *et al.*, 1980) se basa en la permeabilización de la membrana plasmática y que permite determinar el contenido del “citoplasma” y la “vacuola” (siempre así), se decidió entonces, utilizar la cepa silvestre para comparar nuestros resultados con los obtenidos por este procedimiento. Este es más sencillo y consume menos tiempo, pero es demasiado simplista y se enfoca casi exclusivamente en la compartimentalización vacuolar y citoplasmática y tiende a ignorar la contribución del contenido de potasio de otros orgánulos, en el potasio intracelular total. Se desarrollaron experimentos paralelos, en los cuales la membrana plasmática fue permeabilizada con citocromo C. Coincidiendo con observaciones previas, se determinó un contenido alto de potasio en las vacuolas de células cultivadas en condiciones no limitantes del catión (Okorokov *et al.*, 1980; Perkins y Gadd, 1993). De esta manera, se cuantificó un 55% de potasio en la fracción vacuolar y un 45% en la fracción citoplasmática en células cultivadas en condiciones no limitantes de potasio. Por otra parte, se confirmó una drástica movilización de potasio vacuolar hacia el citoplasma en células sometidas a un ayuno de potasio, determinándose un 28% de potasio en la vacuola y un 72% en el citoplasma (Figura 23).



**Figura 23. Distribución intracelular de potasio en condiciones no limitantes y limitantes del catión en la cepa silvestre.** La membrana plasmática fue permeabilizada con Citocromo C como se detalla en materiales y métodos. Los valores se presentan en porcentaje. Las barras de error corresponden a la desviación estándar.

### 1.3. Distribución intracelular de cationes en células sódicas.

Cuando el medio YPD fue suplementado con 0,8 M NaCl, se observó que las cepas mostraron un comportamiento diverso. Tanto la cepa silvestre como el mutante *vx1* crecieron de manera similar, *vam6* y *ptc1* tuvieron un crecimiento ligeramente menor, mientras que el mutante *nhx1* que carece de un transportador vacuolar de potasio (antiportador  $K^+$  ( $Na^+$ )/ $H^+$ ), presentó un crecimiento mucho más limitado (Figura 24).



**Figura 24. Ensayos de crecimiento en medio líquido.** Las cepas indicadas se crecieron en medio YPD suplementado con 0,8 M de NaCl durante 30 horas a 28°C y se midió la densidad óptica ( $DO_{600}$ ) cada hora.

Más concretamente, en estas condiciones, (YPD suplementado con 0,8 M de NaCl), el valor de  $\mu$  de la cepa silvestre fue de 0,28 y en los mutantes  *$\Delta ptc1$* ,  *$\Delta vam6$* ,  *$\Delta vx1$*  fue 0,26, 0,24 y 0,28 respectivamente, mientras que en el mutante  *$\Delta nhx1$*  fue de 0,14. Como pudo observarse el mutante  *$\Delta nhx1$*  no presentó un buen crecimiento en alto sodio, lo que sugiere la importancia de este transportador vacuolar de potasio y sodio en la homeostasis de estocaciones, particularmente en la destoxificación de sodio mediante su acumulación en vacuola. Bajo estas condiciones de cultivo, todas las cepas estudiadas acumularon cantidades significativas de sodio, cercanos a los valores de potasio medidos (Tabla 6).

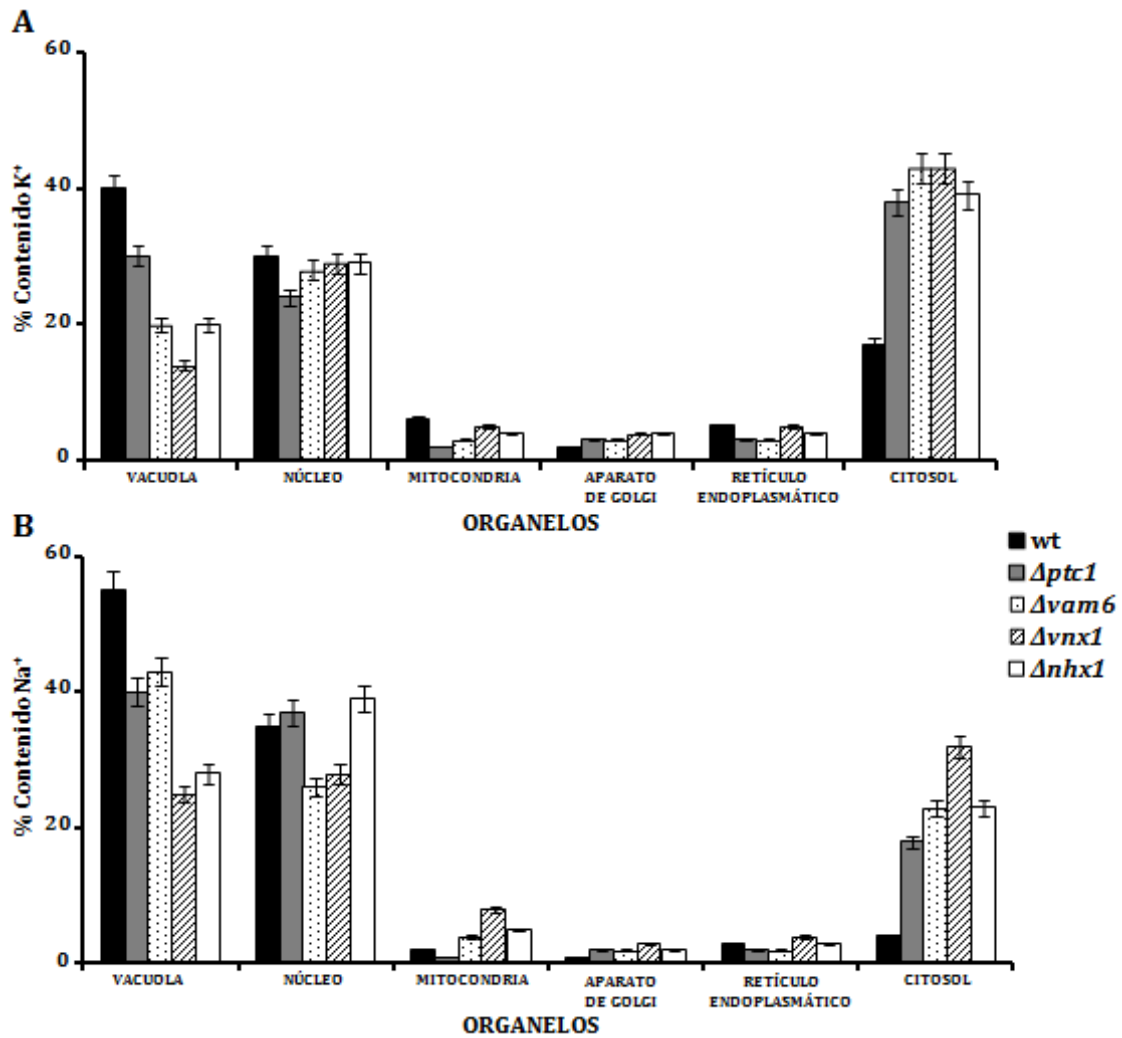
Hay que resaltar que el mutante  *$nhx1$* , la cepa que presentó menor crecimiento en presencia de sodio, fue la única cuyo contenido intracelular de sodio fue mayor que el de potasio.

**Tabla 6. Contenido total de potasio y sodio en células cultivadas en sodio.** Las células fueron cultivadas en YPD suplementado con 0,8 M NaCl. Los datos son la media de cinco experimentos y las diferentes letras representan diferencias estadísticamente significativas entre las cepas bajo las mismas condiciones (Test de Tukey,  $P < 0,05$ ).

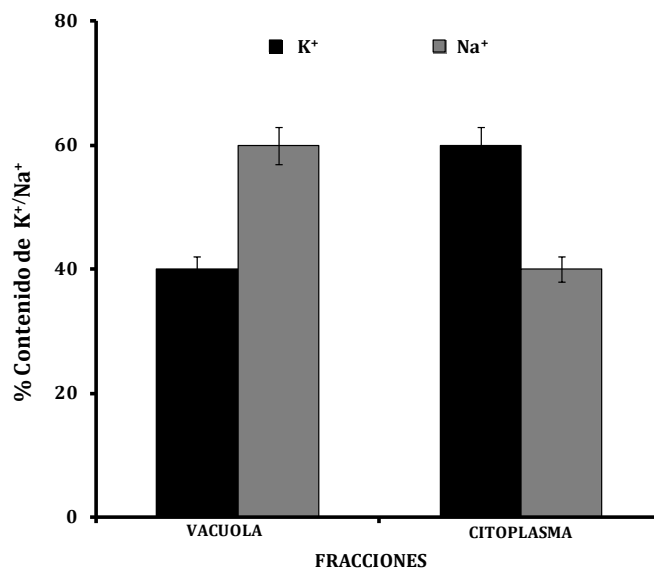
Cepa	Contenido Intracelular Total de K <sup>+</sup> y Na <sup>+</sup> en células cultivadas en sodio	
	K <sup>+</sup> (nmoles.mg de célula)	Na <sup>+</sup> (nmoles.mg de célula)
<b>BY4741</b>	<b>260 ± 20<sup>a</sup></b>	<b>228 ± 19<sup>a</sup></b>
<b><i>Δptc1</i></b>	<b>364 ± 28<sup>c</sup></b>	<b>328 ± 47<sup>b</sup></b>
<b><i>Δvam6</i></b>	<b>275 ± 12<sup>a</sup></b>	<b>245 ± 22<sup>a</sup></b>
<b><i>Δvnx1</i></b>	<b>322 ± 31<sup>b</sup></b>	<b>255 ± 19<sup>a</sup></b>
<b><i>Δnhx1</i></b>	<b>282 ± 46<sup>a</sup></b>	<b>334 ± 20<sup>b</sup></b>

El siguiente objetivo fue estudiar la distribución intracelular de potasio y sodio en la cepa silvestre y sus mutantes isogénicos, cultivados en 0,8 M NaCl. Como puede observarse en la Figura 25, bajo estas condiciones de cultivo, la cepa silvestre acumuló mayores cantidades de cationes en la vacuola que en el citosol y esto fue mucho más significativo en el caso del sodio, manteniéndose niveles extremadamente bajos de este catión en el citosol, sugiriendo la función clave de la vacuola en el secuestro de sodio. Esta función fue confirmada por experimentos de permeabilización de la membrana plasmática, los cuales indican que alrededor de un 60% del sodio total fue mantenido en la vacuola (Figura 26).





**Figura 25. Distribución intracelular de potasio (A) y sodio (B) en células cultivadas en 0,8 M NaCl.** Las células fueron tratadas como se describe en Figura 18 para determinar el contenido de cationes. Los datos son la media de cuatro experimentos. Los valores se presentan en porcentaje. Las barras de error corresponden a la desviación estándar.

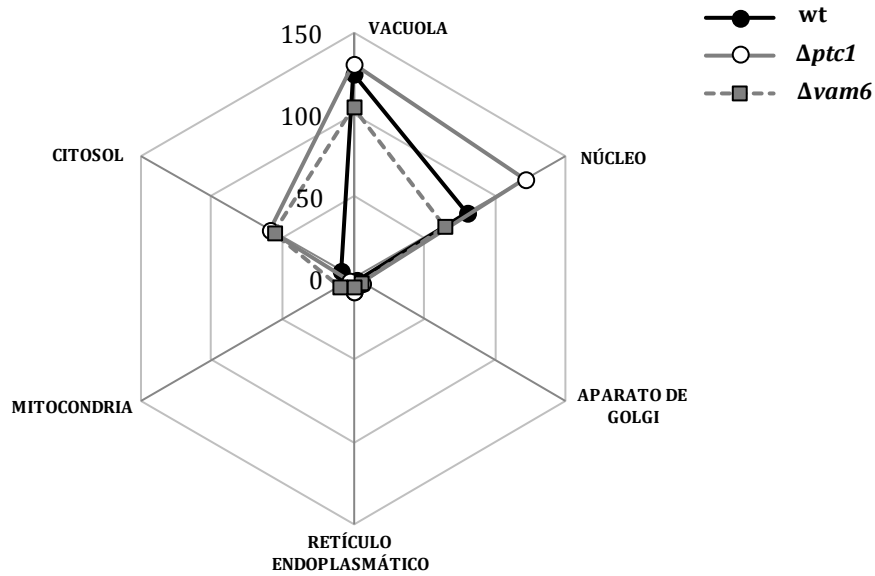


**Figura 26. Distribución intracelular de potasio y sodio en la cepa silvestre.** La membrana plasmática fue permeabilizada con Citocromo C como se detalla en materiales y métodos. Los valores se presentan en porcentaje. Las barras de error corresponden a la desviación estándar.

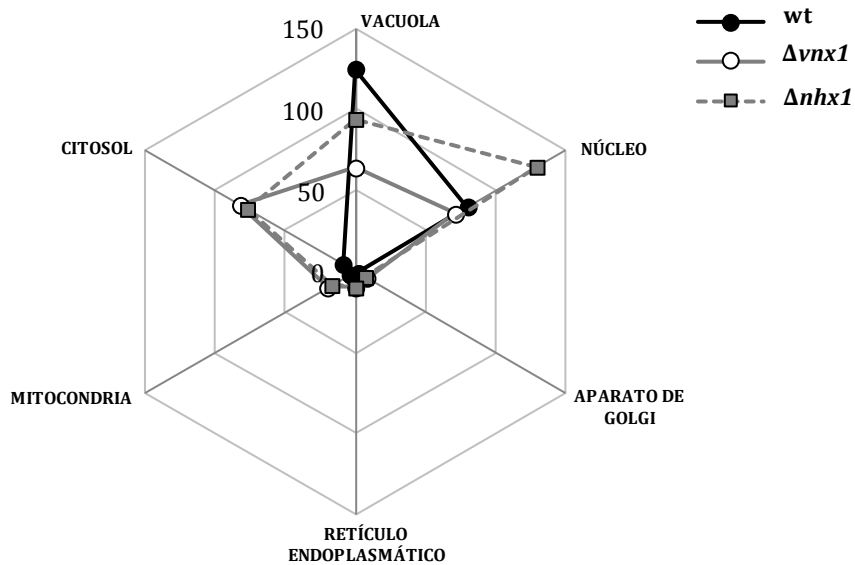
Los resultados de la Figura 25, además de mostrar que el citosol está prácticamente libre de sodio, revelan también que el núcleo contenía sodio y potasio en cantidades bastante similares, lo cual no fue el caso de la mitocondria, aparato de Golgi y retículo endoplasmático, en los cuales los porcentajes de sodio fueron menores que los de potasio para la cepa silvestre. Una vez más, los cuatro mutantes vacuolares mostraron una distribución alterada de cationes, conteniendo menos potasio y sodio en la vacuola y mayores cantidades de ambos cationes en el citosol. El ratio de sodio vacuolar con respecto al sodio citosólico ilustra claramente un defecto de la distribución de este catión en los mutantes estudiados: mientras que el ratio para la cepa silvestre fue 13,7, en los diferentes mutantes los valores estuvieron comprendidos entre 2,2 (*ptc1*) y 0,7 (*vnx1*). Gráficas radar del contenido de sodio en la cepa silvestre y los mutantes se presentan en la Figura 27.

En definitiva, nuestros resultados muestran que mientras la cepa silvestre mantuvo el citosol virtualmente libre de sodio, todos los mutantes estudiados presentaron problemas en la compartimentalización del catión, siendo especialmente relevante el caso de los dos mutantes afectados en el transporte vacuolar (*vnx1* y *nhx1*).

**A**



**B**



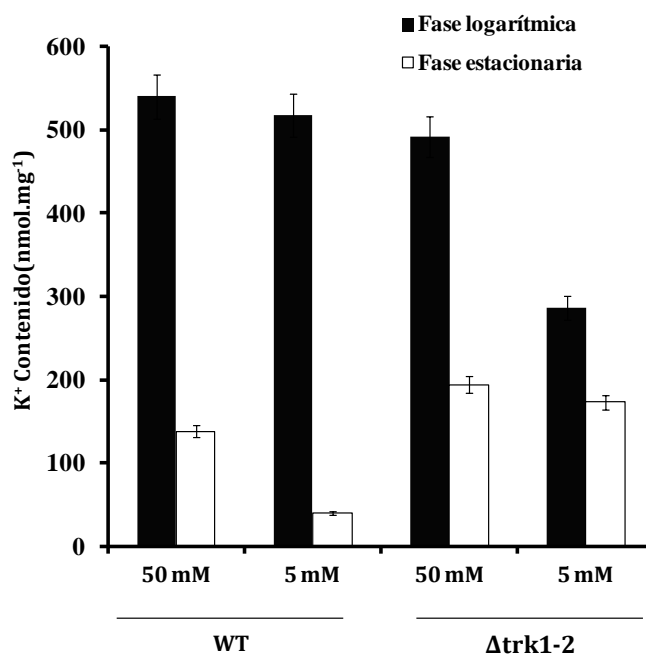
**Figura 27.** Gráfica radar que compara la distribución intracelular de sodio entre la cepa silvestre y mutantes con morfología vacuolar alterada ( $\Delta ptc1$  y  $\Delta vam6$ ) (A) y con los mutantes que carecían de un transportador vacuolar de cationes ( $\Delta vnx1$  y  $\Delta nhx1$ ) (B). Las células fueron cultivadas toda la noche en medio YPD suplementado con 0,8 M de NaCl. Estos mutantes fueron tratados como se describe en la Figura 18 para determinar el contenido de cationes. Los valores se presentan en nmoles.mg de célula.

#### **1.4. Distribución intracelular de potasio en la cepa silvestre y en el mutante *trk1-2* en distintas fases de crecimiento.**

- Con el objetivo de estudiar el posible efecto de la falta del principal sistema de transporte de potasio a nivel de la membrana plasmática (*Trk1-2*) en la distribución intracelular de potasio, en diferentes condiciones y fases de crecimiento, se aislaron la vacuola y el núcleo de *S. cerevisiae* por ser estos orgánulos los principales reservorios de potasio intracelular. De igual manera, se consideró el resto de potasio como “citoplasmático” siendo conscientes de que se incluyen en este concepto otros organelos conteniendo cantidades bajas del catión. El procedimiento utilizado para el aislamiento de vacuolas y núcleos es el mismo utilizado para los mutantes vacuolares anteriormente estudiados.

Se comparó la distribución intracelular de potasio en el doble mutante *trk1,2* con la cepa silvestre en las fases logarítmica (10 horas) y estacionaria (32 horas), así como en las concentraciones de 50 y 5 mM de KCl (concentración limitante para el crecimiento de este mutante).

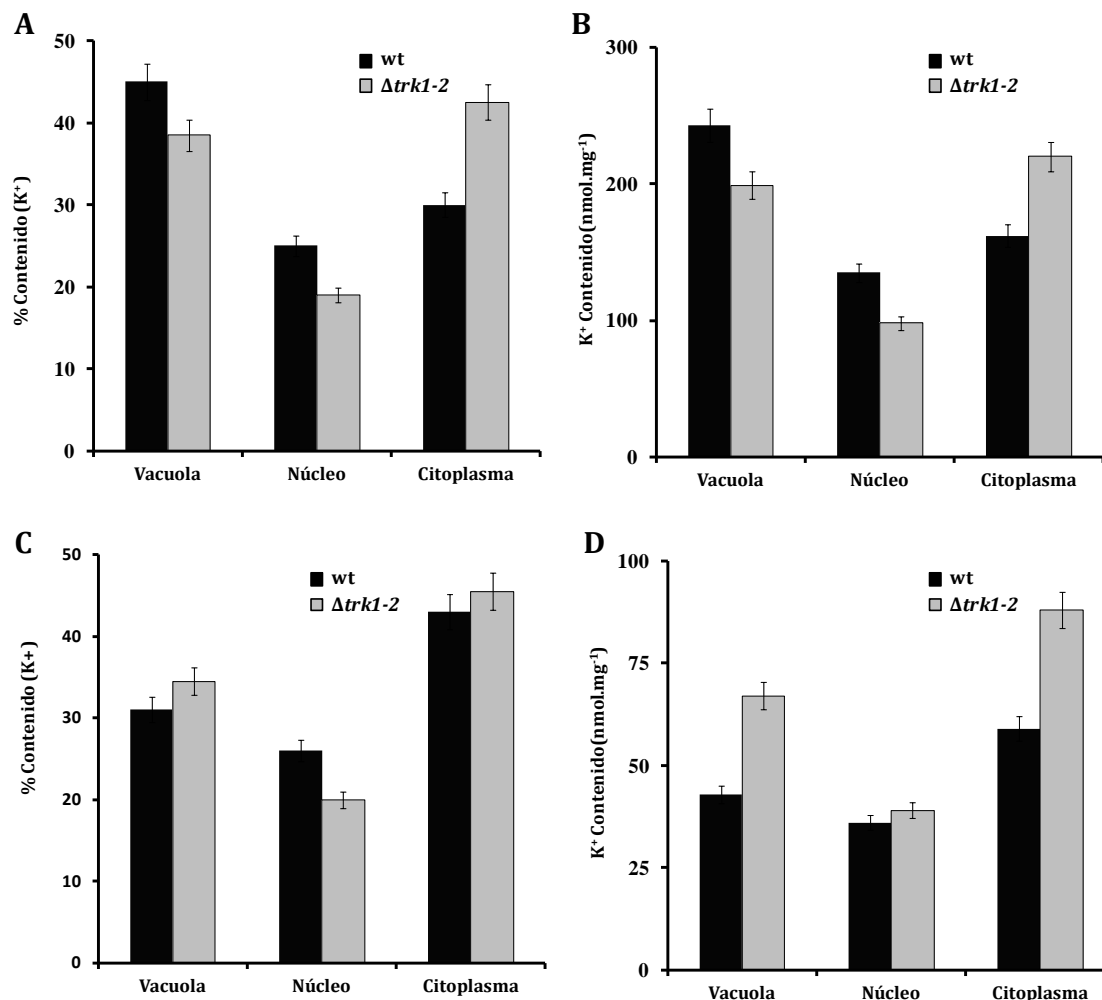
Bajo estas condiciones de crecimiento, el contenido intracelular de potasio entre la cepa silvestre y el doble mutante fue diferente tanto a nivel de concentración de potasio, así como a nivel de fase de crecimiento. En fase logarítmica y a 50 mM KCl, se midieron valores de potasio parecidos en las dos cepas. Estos valores también fueron similares a los medidos en la cepa silvestre a 5 mM KCl pero muy superiores a los de la cepa mutante en las mismas condiciones. Es interesante resaltar, la diferencia en el contenido de potasio en la cepa silvestre entre las dos fases en ambas concentraciones; sin embargo, en el doble mutante estas diferencias son menores en la fase estacionaria (Figura 28).



**Figura 28. Contenido total de potasio de la cepa silvestre y el doble mutante *trk1,2* en 50 mM 5 mM de KCl en fase logarítmica y estacionaria.** Las células se cultivaron en YNB-F suplementado con 50 mM KCl o 5 mM KCl durante 10 horas (fase logarítmica) o 32 horas (fase estacionaria). Estas cepas fueron tratadas como se describe en la Figura 18 para determinar el contenido de cationes. Los datos son la media de tres experimentos. Las barras de error corresponden a la desviación estándar.

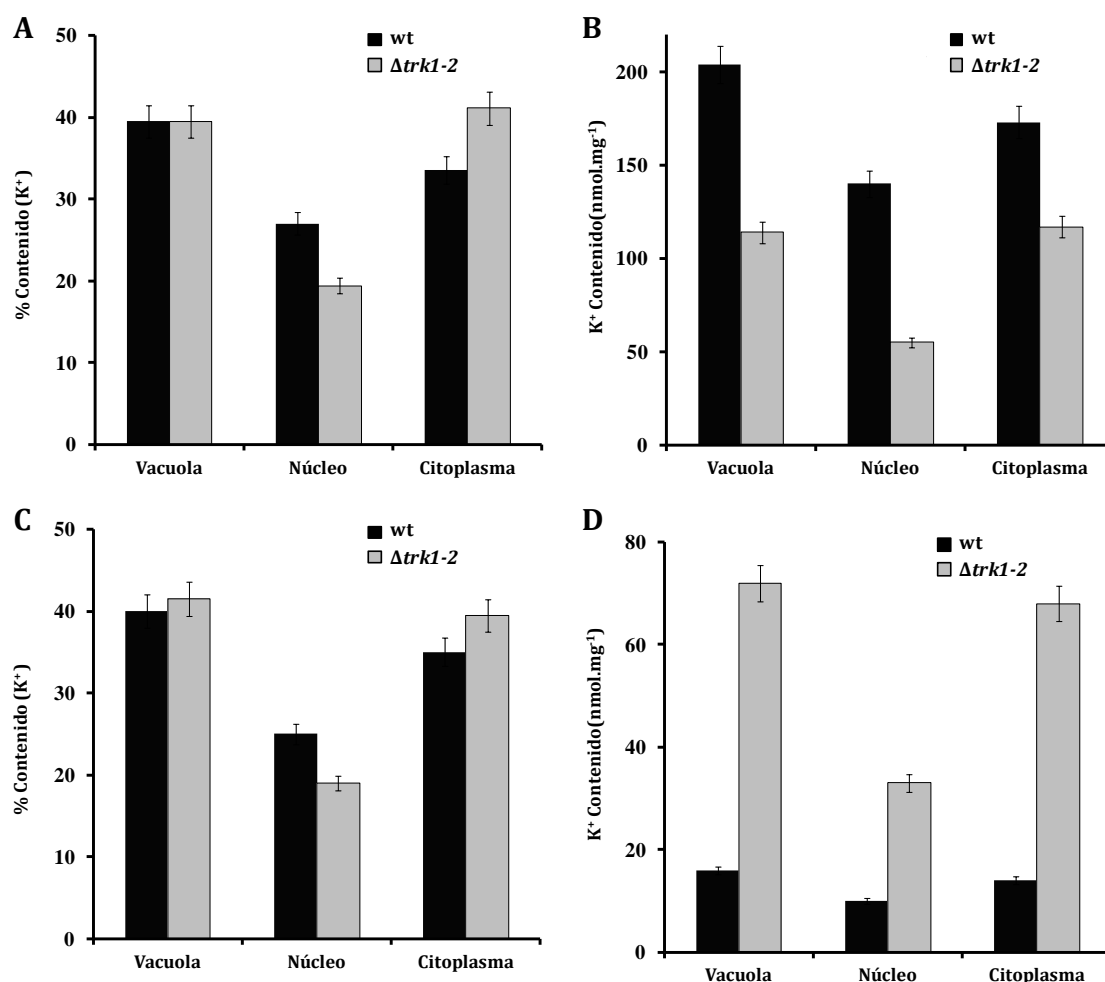
Estos resultados sugieren que el doble mutante retiene más potasio en fase estacionaria en comparación con la cepa silvestre, independientemente de la concentración de potasio en la cual esté creciendo.

En cuanto a la distribución intracelular de potasio en 50 mM, la vacuola de la cepa silvestre acumuló mayor cantidad de potasio que el doble mutante en la fase logarítmica, sin embargo, este último acumuló mayor cantidad del catión en fase estacionaria. Los valores de potasio en el núcleo fueron menores en el doble mutante en fase logarítmica. Es interesante que el doble mutante acumulara más potasio en el citoplasma, lo que pudiera ser reflejo de las alteraciones en la homeostasis de cationes, como se observa en la Figura 29. El potasio del "citoplasma" corresponde a un valor deducido y contiene otros organelos como mitocondria, retículo endoplasmático y aparato de Golgi.



**Figura 29. Distribución intracelular de potasio en la cepa silvestre y el doble mutante *trk1,2* en 50 mM KCl en fase logarítmica (A y B) y estacionaria (C y D), presentada en porcentaje (A y C) y en nmoles.mg de célula (B y D).** Las células se cultivaron en YNB-F suplementado con 50 mM KCl durante 10 horas (fase logarítmica) o 32 horas (fase estacionaria). Estas cepas fueron tratadas como se describe en la Figura 18 para determinar el contenido de cationes.

Los resultados para la distribución intracelular de potasio en células crecidas en 5 mM de KCl, indicaron que, fundamentalmente, el doble mutante presentó mayor cantidad de potasio tanto en vacuola como en núcleo y citoplasma, durante la fase estacionaria de crecimiento. Además de ello, y de acuerdo con los valores presentados en la Figura 30, durante la fase exponencial, el doble mutante poseía cantidades significativamente menores de potasio que la cepa silvestre, tanto a nivel vacuolar como nuclear y “citoplasmático” (Figura 30).



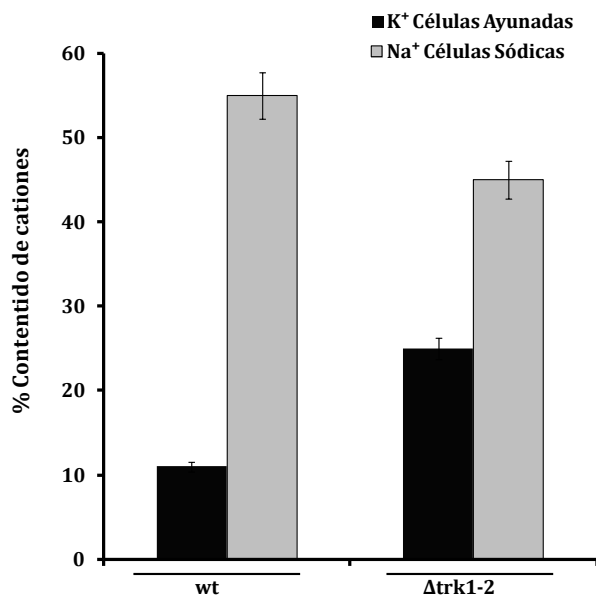
**Figura 30. Distribución intracelular de potasio de la cepa silvestre y el doble mutante *trk1,2* en 5 mM KCl en fase logarítmica ( A y B) y estacionaria ( C y D), presentada en porcentaje ( A y C) y en nmoles.mg de célula(B y D).** Las células se cultivaron en YNB-F suplementado con 50 mM KCl durante 10 horas (fase logarítmica) o 32 horas (fase estacionaria). Estas cepas fueron tratadas como se describe en la Figura 18 para determinar el contenido de cationes.

La Tabla 7 es un resumen de los valores (en nmoles/mg de célula) obtenidos en las diversas condiciones estudiadas. En términos generales, a 5 mM KCl el mutante acumula claramente menos potasio que el control en todos sus organelos en fase logarítmica. Además es llamativo que el mutante, a su vez, retiene más potasio durante la fase estacionaria de crecimiento en ambas concentraciones.

**Tabla 7. Distribución intracelular de potasio en la cepa silvestre y el doble mutante *trk1,2* en 50 mM y 5 mM de KCl en fase logarítmica y estacionaria (nmoles/mg de célula). En rojo y azul se resaltan las diferencias de especial interés.**

	wt				<i>Δtrk1-2</i>			
	50 mM		5 mM		50 mM		5 mM	
	Fase Logarítmica	Fase Estacionaria	Fase Logarítmica	Fase Estacionaria	Fase Logarítmica	Fase Estacionaria	Fase Logarítmica	Fase Estacionaria
Vacuola	243	43	204	16	199	67	114	72
Núcleo	135	36	140	10	98	39	55	33
Citoplasma	162	59	173	14	220	88	117	68

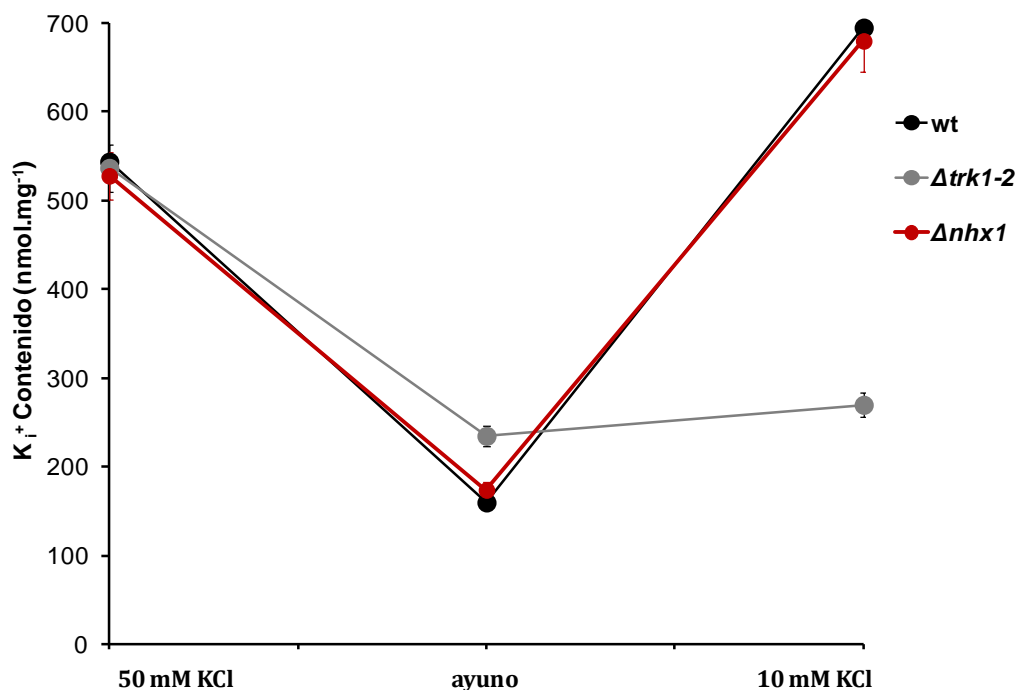
• Con el objetivo de evaluar el comportamiento del doble mutante en condiciones de estrés (ayuno de potasio y alto sodio 0,8 M de NaCl), se estudió el contenido de estos cationes en vacuola, pues resultó ser el dato más interesante en cuanto a los cambios en los contenidos de estos cationes. Se determinó que al final del ayuno de potasio, la vacuola de la cepa silvestre había pasado de un 45% a un 11% del potasio intracelular, mientras que en el doble mutante estos cambios fueron mucho menos importantes (de un 39% a un 25%). En cuanto al contenido de sodio en células crecidas en 0,8 M de NaCl, la cepa silvestre acumuló más sodio que el doble mutante en la vacuola (55% y 45%, respectivamente), lo que podría indicar una homeostasis del catión más efectiva en la cepa control y lo cual debe estar relacionado con la mayor sensibilidad a sodio observada en las cepas carentes de Trk. (Figura 31).



**Figura 31. Contenido vacuolar de potasio en células ayunadas y de sodio en células sódicas en la cepa silvestre y el doble mutante *trk1-2*.** Para el ayuno las células fueron cultivadas en medio YNB-F durante 10 horas a una concentración de 50 mM de KCl y luego inoculadas en el mismo medio sin potasio por 4 horas. En el experimento de células sódicas, las células fueron cultivadas en medio YNB-F durante 10 horas a una concentración de 50 mM de KCl y suplementado con 0,8 M de NaCl. Estas cepas fueron tratadas como se describe en la Figura 18 para determinar el contenido de cationes.



En un experimento adicional, nos preguntamos sobre la rapidez con la que la célula puede movilizar el potasio hacia la vacuola una vez que dispone de suficiente cantidad del catión. Con el objetivo de determinar la capacidad de transporte hacia la vacuola, se diseñó un experimento en el que tras un ayuno de cuatro horas, se añadió a las células 10 mM de KCl y tras 20 minutos se determinó el contenido de potasio intracelular y de la fracción vacuolar. Este experimento se realizó en la cepa silvestre, en el mutante *trk1,2* y en el mutante *nhx1* carente de un antiportador catión/H<sup>+</sup> de la membrana vacuolar. (Figura 32).

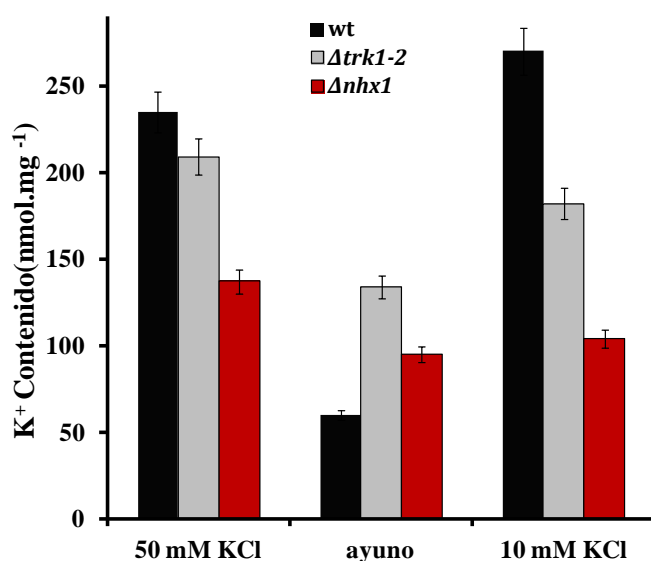


**Figura 32. Determinación del contenido intracelular de potasio total en 50 mM de KCl, en ayuno de potasio y luego de la adición de 10 mM de KCl en la cepa silvestre, el doble mutante *trk1-2* y el mutante del transportador de la vacuola *nhx1*.** Estas cepas fueron tratadas como se describe en la Figura 18 para determinar el contenido de cationes. Los datos corresponden a la media de tres experimentos. Las barras de error corresponden a la desviación estándar.

Tras cultivar las células en 50 mM de KCl se determinó el contenido intracelular de potasio para las tres cepas estudiadas midiéndose valores muy similares del catión. Posteriormente la células se ayunaron en el mismo medio sin potasio por cuatro horas siendo similares en su contenido la cepa silvestre y el mutante *nhx1*, sin embargo el doble mutante presentó un mayor contenido del catión lo que concuerda con datos publicados (Navarrete *et al.*, 2010). Luego del ayuno de cuatro horas se le añadió a las células 10 mM de KCl, y tras 20 minutos se determinó que la cepa silvestre y el mutante *nhx1* presentaron un contenido intracelular de potasio incluso superior al valor inicial

(50 mM KCl), mientras que en el doble mutante *trk1,2* este valor fue significativamente menor, pues es incapaz de incorporar a la célula potasio eficientemente .

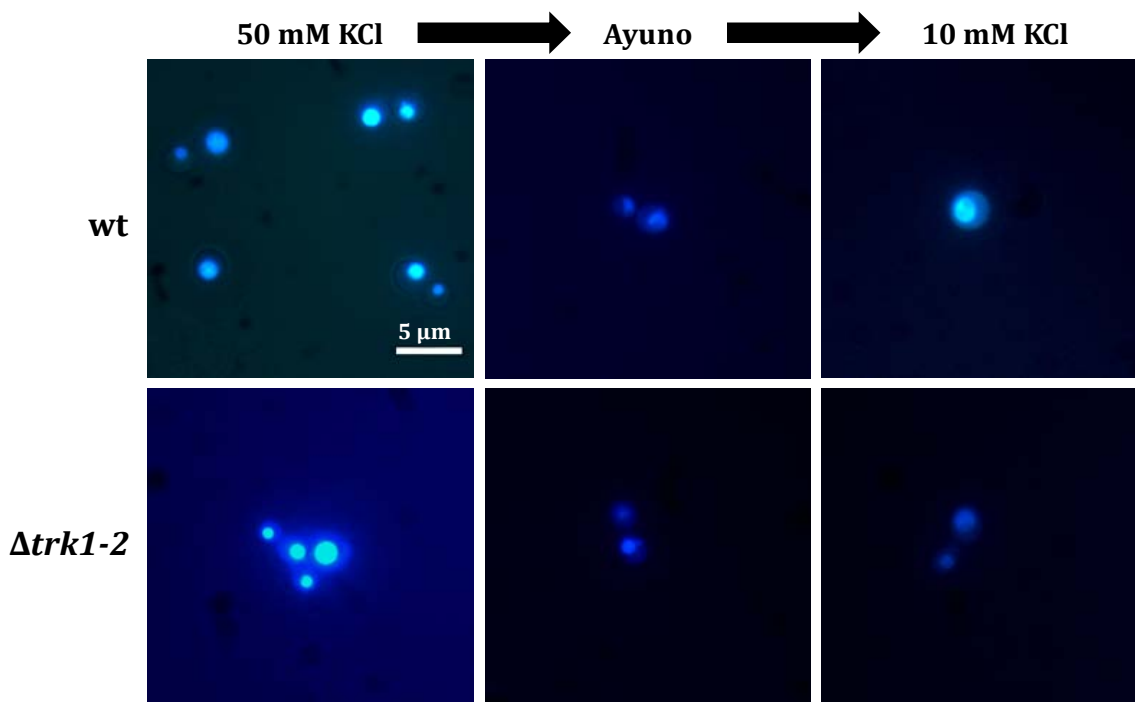
En cuanto al contenido vacuolar, se determinaron en 50 mM de KCl valores similares de contenido entre la cepa silvestre y el doble mutante, sin embargo el mutante *nhx1* registró valores menores. En ayuno sin embargo, la vacuola del doble mutante perdió menos potasio que las otras dos cepas; y finalmente al añadir 10 mM de KCl, interesantemente la cepa silvestre incluso aumentó su contenido vacuolar del catión en comparación con la condición de 50 mM de KCl. El mutante *nhx1*, al tener afectado el transportador vacuolar, presentó un contenido menor del catión (Figura 33).



**Figura 33. Determinación de la capacidad de transporte vacuolar luego del ayuno en la cepa silvestre, el doble mutante *trk1-2* y el mutante del transportador de la vacuola *nhx1*.** Las células fueron cultivadas en medio YNB-F durante 10 horas a una concentración de 50 mM de KCl y luego inoculadas en el mismo medio sin potasio por 4 horas. Posteriormente, se añadió a las células 10 mM de KCl. Se aislaron las vacuolas en cada condición y fueron tratadas como se describe en la Figura 18 para determinar el contenido de cationes. Los datos corresponden a la media de tres experimentos. Las barras de error corresponden a la desviación estándar.

- Con el objetivo de determinar posibles cambios en el tamaño ( $\mu\text{m}$ ) de la célula y vacuola de la levadura bajo distintas condiciones de crecimiento, se utilizaron una serie de compuestos fluoróforos (CellTracker Blue CMAC y C-MAC Arg, Invitrogen®) que permitieran visualizar estas variaciones mediante microscopía de fluorescencia. Las células fueron cultivadas en medio YNB-F durante 10 horas a una concentración de 50 mM de KCl y luego suspendidas en el mismo medio sin potasio por 4 horas. Luego se

añadió a las células 10 mM de KCl y tras 20 minutos. Se determinó el tamaño celular y vacuolar en cada condición de crecimiento (Figura 34).

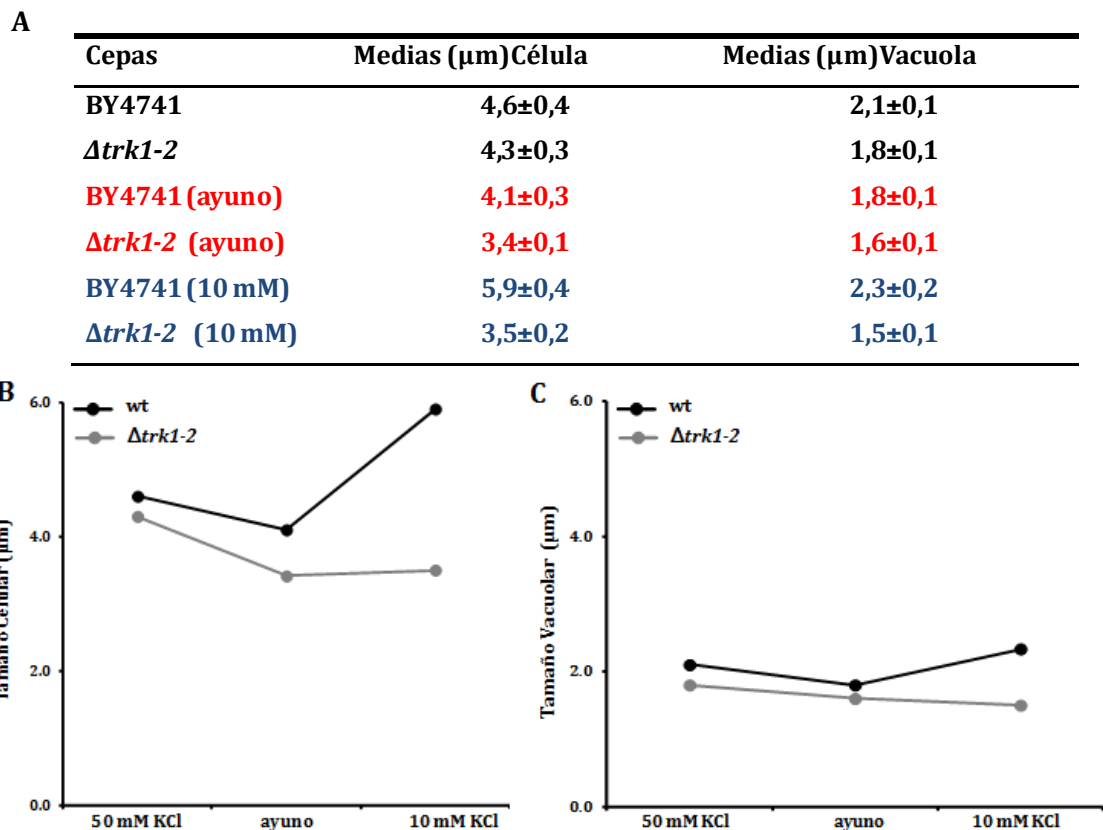


**Figura 34. Levaduras y sus respectivas vacuolas observadas mediante microscopía de fluorescencia en la cepa silvestre y el doble mutante *trk1-2*.** Las células fueron cultivadas en medio YNB-F durante 10 horas a una concentración de 50 mM de KCl, seguidamente ayunadas en el mismo medio sin potasio durante cuatro horas, se les añadió 10 mM de KCl. Las células fueron teñidas en cada condición con los compuestos fluoróforos (CellTracker Blue CMAC y C-MAC Arg, Invitrogen®) (aumento 100 X). Se presentan una fotografía representativa de 30 que se tomaron para condición.

Los resultados para la condición de 50 mM de KCl indicaron diferencias no significativas ( $p < 0,0001$ ) entre las cepas estudiadas en cuanto al tamaño celular, sin embargo a nivel vacuolar estas diferencias son significativas. En la condición de ayuno de potasio se determinaron diferencias significativas ( $p < 0,0001$ ) en relación al tamaño celular y vacuolar, se observó una disminución de tamaño tanto a nivel celular como vacuolar en comparación con la condición de 50 mM de KCl. Finalmente, luego de las cuatro horas de ayuno, se añadió 10 mM de KCl y tras 20 minutos se midió el tamaño celular y vacuolar. Los resultados indicaron diferencias significativas ( $p < 0,0001$ ) entre las cepas estudiadas en cuanto al tamaño celular y de la vacuola. Los valores en  $\mu\text{m}$  (medias) del tamaño celular y vacuolar de ambas cepas para las condiciones estudiadas se presentan en la (Figura 35A).

La Figura 35B muestra las medidas del tamaño celular realizadas durante las distintas etapas (50mM KCl, ayuno y 10 mM de KCl), que indican que durante el ayuno se produjo una disminución de tamaño en las dos cepas y que tras la adición de 10 mM KCl, la cepa silvestre aumentó su tamaño a niveles incluso superiores al inicial, mientras que el doble mutante no pudo hacerlo, probablemente por su incapacidad para transportar cantidades importantes del catión en esas condiciones al interior de la célula.

La Figura 35C muestra las medidas del tamaño vacuolar realizadas durante las distintas etapas (50mM KCl, ayuno y 10 mM de KCl), que indican que durante el ayuno se produjo una disminución de tamaño en las dos cepas y que tras la adición de 10 mM KCl, la cepa silvestre aumentó también su tamaño vacuolar a niveles incluso superiores al inicial (50 mM) y el doble mutante no presentó aumento en el tamaño de su vacuola.



**Figura 35. Tamaño celular y vacuolar en la cepa silvestre y el doble mutante *trk1,2*.** (A) recoge los valores en  $\mu\text{m}$  (medias) del tamaño celular y vacuolar de ambas cepas para las condiciones estudiadas, se midieron aproximadamente 100 células para cada cepa en cada condición. (B) muestra las medidas de tamaño celular ( $\mu\text{m}$ ) y (C) tamaño vacuolar ( $\mu\text{m}$ ). Las células crecieron en 50 mM KCl, se ayunaron 4 horas y posteriormente se añadió 10 mM KCl durante 20 minutos.

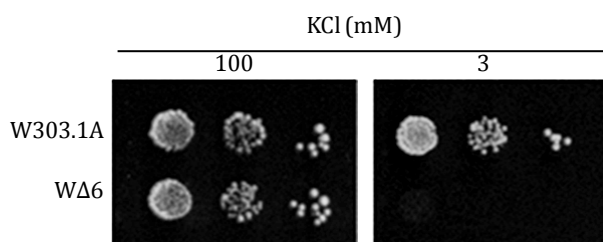


## 2. Papel de la proteína Trk1 en la adaptación frente a cambios en los niveles externos de potasio.

### 2.1. Determinación de la función del principal transportador de potasio de la membrana plasmática en la adaptación a cambios en las concentraciones externas de potasio.

Recientemente se ha publicado (Kahm *et al.*, 2012) el ajuste del potasio intracelular como ejemplo de adaptación imperfecta a cambios en las concentraciones externas del catión: la cepa silvestre es capaz de adaptarse a cambios en los niveles de potasio del medio pero no puede mantener la totalidad de su contenido de potasio. De esta manera, la disminución de la concentración extracelular de potasio induce, en un cierto rango de concentraciones, una regulación a la baja del contenido interno hasta alcanzar un estado de equilibrio. En este sentido, es importante preguntarse si la falta del principal transportador de potasio de la membrana plasmática en *S. cerevisiae*, puede afectar el proceso adaptativo de esta levadura.

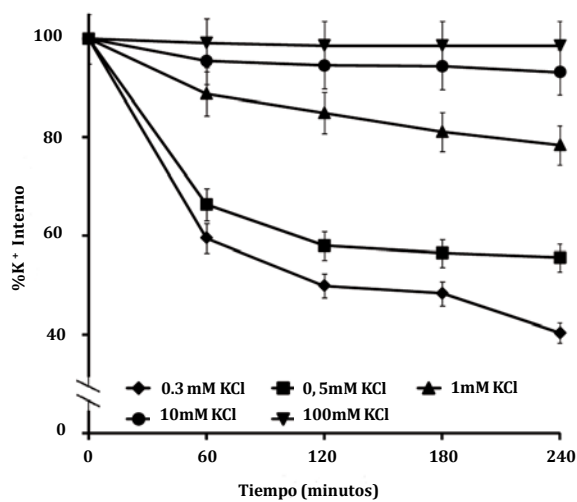
En un experimento preliminar y para caracterizar el comportamiento de las dos cepas, se estudió el crecimiento en medio sólido de la cepa silvestre (W303.1A) y el doble mutante (WΔ6), en 3 mM y 100 mM de KCl. (Figura 36).



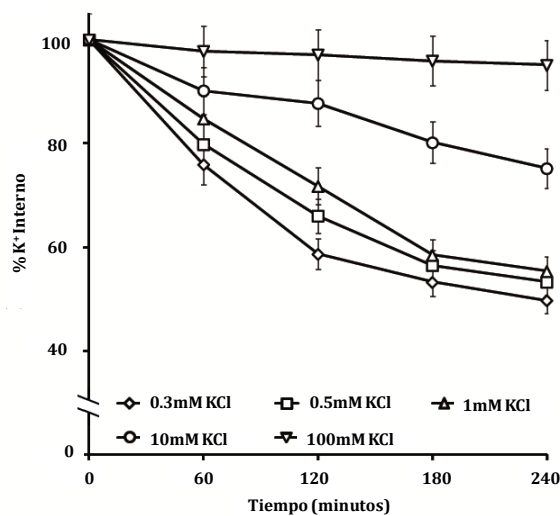
**Figura 36. Crecimiento en concentración baja y alta de potasio en la cepa silvestre (W303.1A) y el doble mutante (WΔ6).** Las cepas fueron precultivadas en medio YNB-F (pH 5,8) conteniendo 100 mM de KCl. Se prepararon diluciones seriadas (1:10) fueron aplicadas en el mismo medio YNB-F suplementado con las concentraciones de potasio indicadas. Las células fueron incubadas a 28°C por dos días.

Los resultados mostraron que las dos cepas crecieron bien en 100 mM de KCl. Sin embargo, mientras la cepa silvestre (W303.1A) fue capaz de crecer a 3 mM de KCl, el doble mutante (WΔ6) no pudo crecer a esta concentración de potasio al carecer del sistema de transporte Trk1-2 y no poder incorporar el catión a la célula cuando fue cultivada a esta baja concentración de potasio.

Con el fin de obtener información sobre la adaptación a cambios en los niveles de potasio, se cultivaron la cepa silvestre y el mutante *trk1,2* en concentraciones no limitantes de potasio y fueron resuspendidas en el mismo medio (YNB-F) con diferentes concentraciones externas de potasio. Los resultados de los experimentos de adaptación a las diferentes concentraciones externas de potasio (Figuras 37 y 38), muestran que la cepa silvestre y el doble mutante fueron capaces de adaptarse a los cambios externos, pero a bajo potasio las concentraciones estacionarias internas fueron diferentes en estas dos cepas.

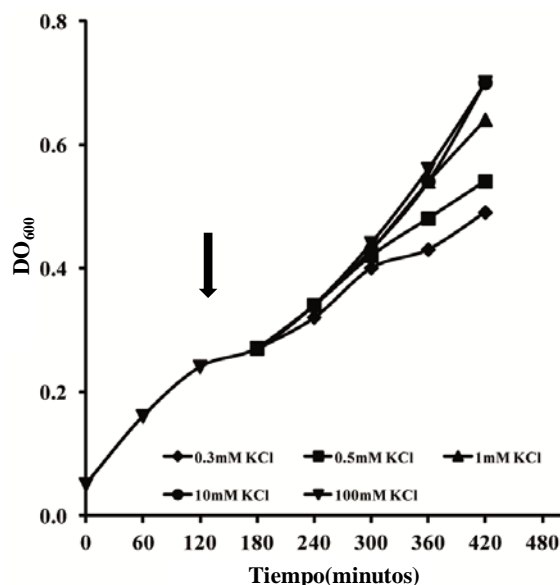


**Figura 37. Evolución del contenido de potasio en función de la concentración externa en la cepa silvestre.** La cepa fue cultivada en 100 mM de KCl, luego resuspendida en diferentes concentraciones del catión y el proceso de adaptación fue seguido a lo largo del tiempo. Las barras de error corresponden a la desviación estándar.

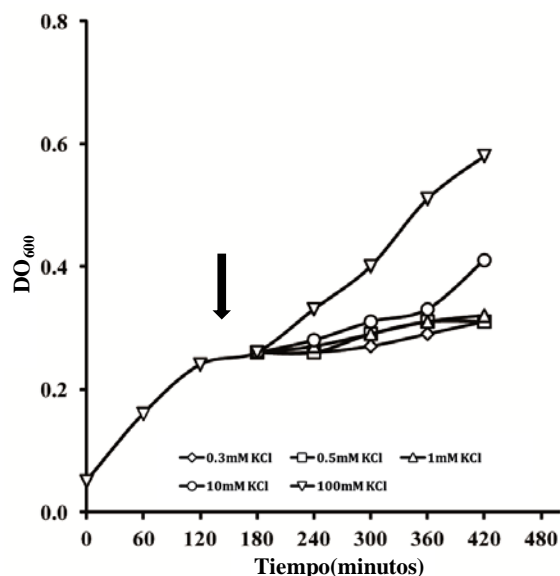


**Figura 38. Evolución del contenido de potasio en función de la concentración externa en el doble mutante *trk 1,2*.** La cepa fue cultivada en 100 mM de KCl, luego resuspendida en diferentes concentraciones del catión y el proceso de adaptación fue seguido a lo largo del tiempo. Las barras de error corresponden a la desviación estándar.

Paralelamente, a los experimentos de adaptación del contenido interno de potasio como respuesta a las distintas concentraciones externas del catión, se determinaron los cambios en la densidad óptica de las cepas (W303.1A y  $\Delta$ 6) en las distintas condiciones (Figuras 39 y 40).



**Figura 39. Cambios en el crecimiento (D.O) en la cepa silvestre.** La cepa fue cultivada en 100 mM de KCl, posteriormente resuspendida en diferentes concentraciones de potasio y paralelamente a la determinación del contenido interno, se cuantificó la densidad óptica (DO<sub>600</sub>). La flecha indica el punto en que la cepa fue resuspendida en las distintas concentraciones externas de potasio.

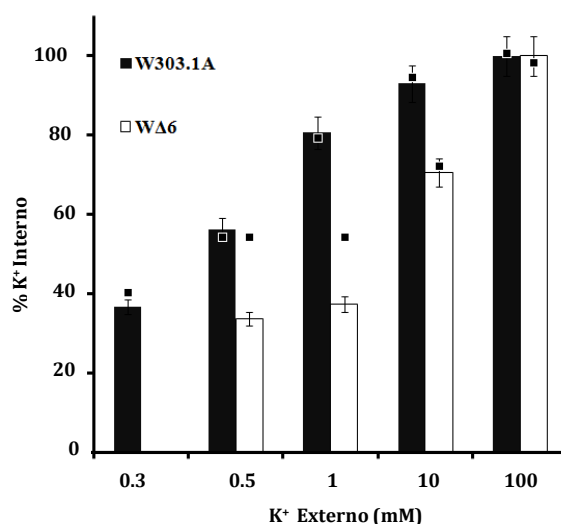


**Figura 40. Cambios en el crecimiento (D.O) en el doble mutante *trk 1,2*.** La cepa fue cultivada en 100 mM de KCl, posteriormente resuspendida en diferentes concentraciones de potasio y paralelamente a la determinación del contenido interno, se cuantificó la densidad óptica (DO<sub>600</sub>). La flecha indica el punto en que la cepa fue resuspendida en las distintas concentraciones externas de potasio.



Los resultados indican que la cepa silvestre presentó densidades ópticas similares para las concentraciones de 100, 10 y 1 mM de potasio y menor crecimiento a 0,5 y 0,3 mM de potasio. Por otra parte, el doble mutante presentó una marcada diferencia entre 100 mM y el resto de las concentraciones estudiadas, en las cuales el crecimiento fue claramente inferior. Esto datos concuerdan con la limitada capacidad de transporte de potasio del doble mutante a bajas concentraciones del catión, lo cual decididamente influye en el crecimiento en medio líquido.

Para determinar si estas concentraciones estacionarias intracelulares dependían de las condiciones iniciales o estaban determinadas solamente por las concentraciones externas se realizó un experimento adicional, las células se cultivaron toda la noche en medio YNB-F con diferentes concentraciones externas de potasio y luego se determinó su contenido de potasio, como se presenta en la Figura 41.



**Figura 41. Concentración interna de potasio en la cepa silvestre (W303.1A) y el doble mutante WΔ6.** Las cepas fueron cultivadas toda la noche a diferentes concentraciones externas de potasio. El estado estable en las concentraciones de las Figuras 37 y 38 se indican en cuadrados. El doble mutante no creció a 0,3 mM de KCl, lo que impidió medir las concentraciones internas de potasio. Las barras de error corresponden a la desviación estándar.

Tanto en la cepa silvestre como el doble mutante la concentración intracelular de potasio estuvo limitada a aproximadamente 500 nmol/mg de célula ( $497 \pm 21$  y  $510 \pm 28$ , respectivamente) cuando la concentración externa de potasio era lo suficientemente alta (100 mM KCl). En la cepa silvestre, la concentración interna fue proporcional a la externa (Figura 41) y coincidió con los estados estacionarios (Figura 37). Sin embargo, en el doble mutante *trk1,2*, no se presentó esta concordancia, después de la resuspensión en medio

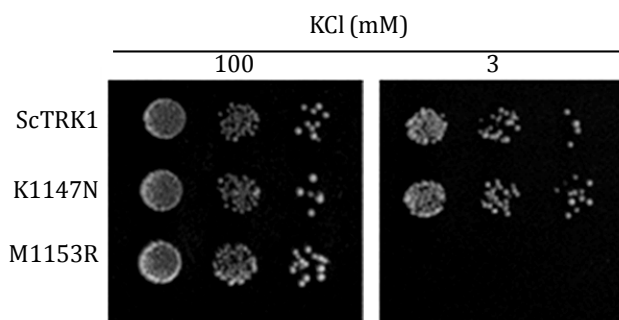
con bajo potasio (0,5-1 mM) (Figuras 38 y 41). Esto sugiere que el doble mutante presentó una adaptación alterada para alcanzar los respectivos estados estables estacionarios cuando fue resuspendido en bajas concentraciones de potasio.

Como un ejemplo, la cepa silvestre incubada por cuatro horas o cultivada toda la noche en 1 mM de KCl, contenía alrededor del 80% del potasio, de las células cultivadas bajo condiciones no limitantes del catión, mientras que el doble mutante *trk1,2* contenía alrededor del 55% cuando fueron incubado cuatro horas en 1 mM de KCl y solamente un 37%, cuando se cultivó toda la noche bajo estas condiciones. A 0,3 mM de KCl, el doble mutante no creció y no se consiguió obtener suficiente cantidad de biomasa para el experimento (Figura 41).

Estos resultados sugieren un importante papel de Trk1,2 en la adaptación a la concentración externa de potasio. Las células que carecen del sistema Trk1,2 son capaces de adaptarse a bajas concentraciones externas de potasio, pero su contenido interno es cuantitativamente diferente a la cepa silvestre. Este efecto puede estar relacionado con un transporte defectuoso y/o a la falta de una posible actividad de señalización dependiente de Trk1,2, pero independiente de su función de transporte.

En un experimento adicional se determinó el volumen celular de ambas cepas cuando crecieron en condiciones no limitantes de potasio (100 mM KCl). En estas condiciones no se encontraron diferencias importantes entre la cepa silvestre y el doble mutante (60 fL y 57 fL, respectivamente).

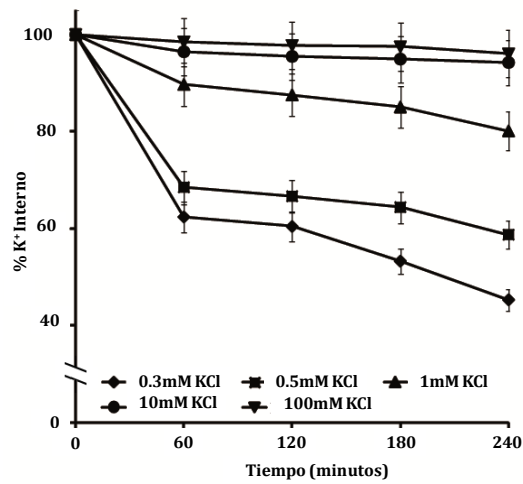
Posteriormente, se estudió el crecimiento de las distintas cepas de *TRK1* (*ScTRK1*, K1147N y M1153R) en bajo potasio (3 mM) y alto potasio (100 mM) en medio sólido de YNB-F), con el objetivo de determinar el posible papel en el transporte o/y señalización de Trk1. (Figura 42).



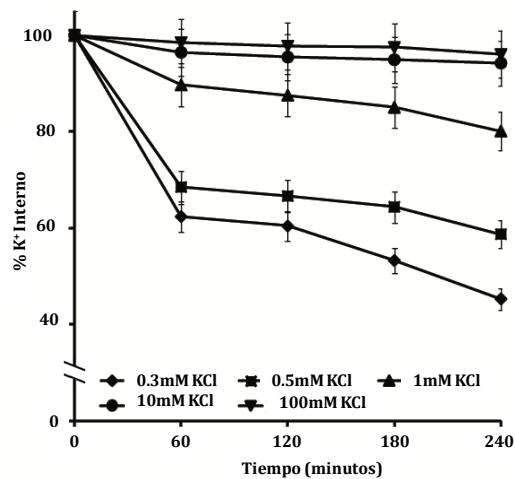
**Figura 42. Crecimiento en concentración baja y alta de potasio de las distintas cepas de *TRK1*.** Las cepas fueron precultivadas en medio YNB-F (pH 5,8) conteniendo 100 mM de KCl. Se prepararon diluciones seriadas (1:10) fueron aplicadas en el mismo medio YNB-F suplementado con las concentraciones de potasio indicadas. Las células fueron incubadas a 28°C por dos días.

Todas las cepas crecieron de manera similar en condiciones no limitantes de potasio (100 mM KCl). La expresión de *TRK1* en el doble mutante mejoró notablemente el crecimiento en condiciones limitantes de potasio (*ScTRK1*). Las cepas transformadas con la versión K1147N de *TRK1*, la cual presenta una sustitución de un residuo de aminoácido de lisina por un residuo de aminoácido de asparragina en la hélice M2<sub>D</sub>, presentó una velocidad máxima ( $V_{max}$ ) de aproximadamente la mitad de la cepa silvestre y fue capaz de crecer a bajo potasio. Por el contrario, en las cepas modificadas con la versión M1153R en el transportador (sustitución de residuo de aminoácido de metionina por un residuo de aminoácido de arginina), el transporte de alta afinidad no fue detectado, registrándose un comportamiento similar al doble mutante *trk1,2*, además no hubo crecimiento en las placas con 3 mM de KCl.

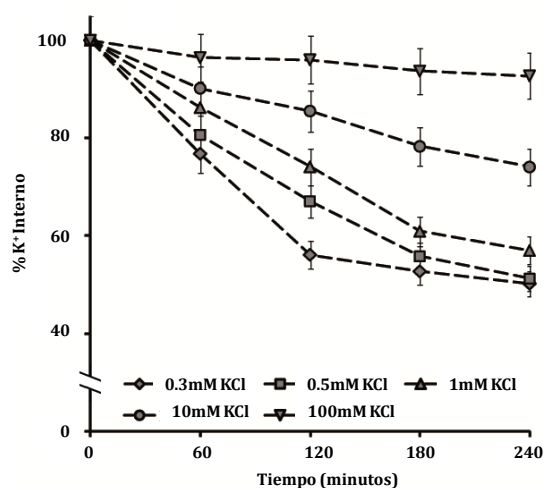
Para comprender mejor la posible relación entre la función del sistema Trk en el transporte de potasio y el ajuste en el potasio como respuesta a diferentes niveles externos del catión, se repitió el mismo tipo de experimentos, utilizando un doble mutante transformado con plásmidos conteniendo diferentes versiones de *TRK1* (Figuras 43, 44 y 45).



**Figura 43. Evolución del contenido de potasio en función de la concentración externa en el doble mutante WΔ6 transformado con *ScTRK1*.** La cepa fue cultivada en 100 mM de KCl, luego resuspendida en diferentes concentraciones del catión y el proceso de adaptación fue seguido a lo largo del tiempo. Las barras de error corresponden a la desviación estándar.

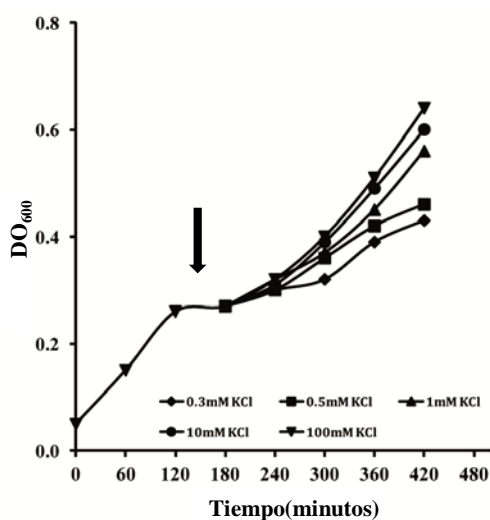


**Figura 44. Evolución del contenido de potasio en función de la concentración externa en el doble mutante WΔ6 transformado con K1147N.** La cepa fue cultivada en 100 mM de KCl, luego resuspendida en diferentes concentraciones del catión y el proceso de adaptación fue seguido a lo largo del tiempo. Las barras de error corresponden a la desviación estándar.

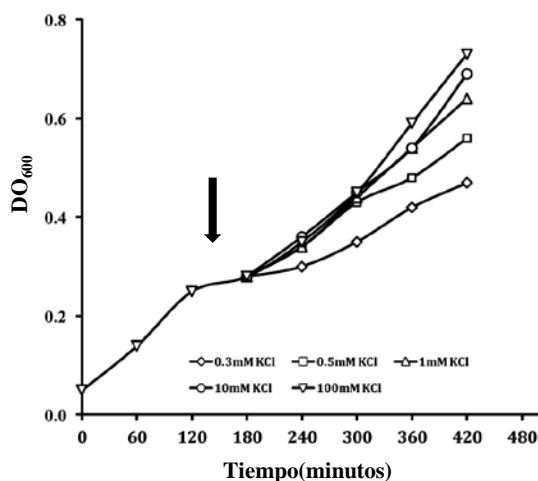


**Figura 45. Evolución del contenido de potasio en función de la concentración externa en el doble mutante WΔ6 transformado con M1153R.** La cepa fue cultivada en 100 mM de KCl, luego resuspendida en diferentes concentraciones del catión y el proceso de adaptación fue seguido a lo largo del tiempo. Las barras de error corresponden a la desviación estándar.

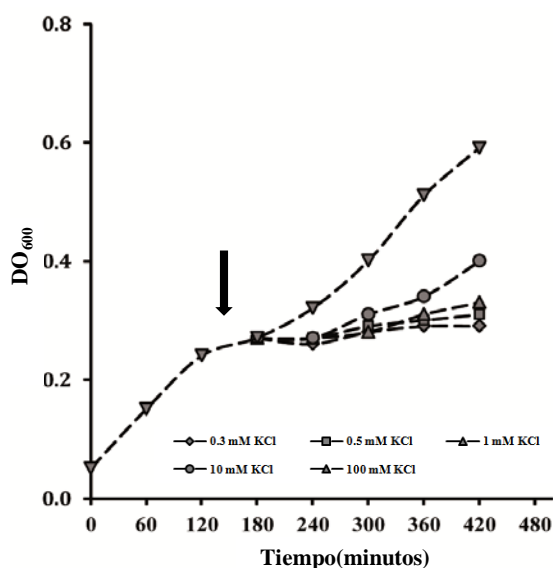
De manera similar que para la cepa silvestre y el doble mutante, también se determinó la densidad óptica de las cepas con las diferentes versiones de *TRK1* en función de las distintas concentraciones externas de potasio en que se resuspendieron (Figuras 46-48).



**Figura 46. Cambios en el crecimiento (D.O) en el doble mutante WΔ6 transformado con ScTRK1.** La cepa fue cultivada en 100 mM de KCl, posteriormente resuspendida en diferentes concentraciones de potasio y paralelamente a la determinación del contenido interno, se cuantificó la densidad óptica (DO<sub>600</sub>). La flecha indica el punto en que la cepa fue resuspendida en las distintas concentraciones externas de potasio.



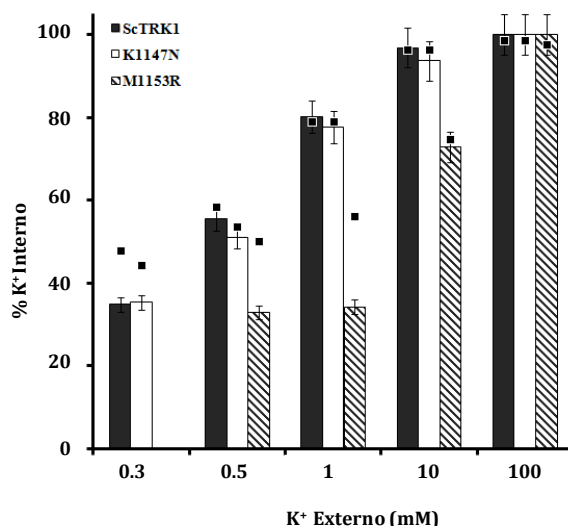
**Figura 47. Cambios en el crecimiento (D.O) en el doble mutanteWA6 transformado con K1147N.** La cepa fue cultivada en 100 mM de KCl, posteriormente resuspendida en diferentes concentraciones de potasio y paralelamente a la determinación del contenido interno, se cuantificó la densidad óptica (DO<sub>600</sub>). La flecha indica el punto en que la cepa fue resuspendida en las distintas concentraciones externas de potasio.



**Figura 48. Cambios en el crecimiento (D.O) en el doble mutanteWA6 transformado con M1153R.** La cepa fue cultivada en 100 mM de KCl, posteriormente resuspendida en diferentes concentraciones de potasio y paralelamente a la determinación del contenido interno, se cuantificó la densidad óptica (DO<sub>600</sub>). La flecha indica el punto en que la cepa fue resuspendida en las distintas concentraciones externas de potasio.

En cuanto a la densidad óptica de las cepas, los resultados muestran que las cepas transformadas con las versiones *ScTRK1* y K1147N presentaron un crecimiento similar a la cepa silvestre, mientras que M1153R presentó un comportamiento similar al doble mutante. Lo que corresponde a lo esperado, tomando en cuenta por ejemplo que la cepa con la versión M1153R, es la que presentó un transporte más defectuoso de potasio en comparación con las versiones *ScTRK1* y K1147N.

Como se esperaba a partir de los resultados antes mencionados, las tres cepas cultivadas bajo condiciones no limitantes de potasio contenían cantidades similares de este catión ( $519 \pm 21$ ,  $496 \pm 29$  y  $511 \pm 20$  nmoles/mg de célula para la cepa silvestre, K1147N y M1153R respectivamente). Cuando se resuspendieron en medio YNB-F con bajas cantidades de potasio, todas las cepas fueron capaces de adaptar sus niveles intracelulares de potasio a las concentraciones externas. Sin embargo, la capacidad de transporte y no sólo la presencia de Trk1 determinó las concentraciones estacionarias internas. La cepa silvestre y la cepa con la versión K1147N de Trk1 se comportaron similarmente, es decir, la concentración interna fue proporcional a la externa y coincidió con los estados estacionarios, mientras que la cepa con la versión M1153R del transportador se comportó de la misma manera que el doble mutante *trk1,2*, es decir, no hubo concordancia entre la concentración interna y la externa (Figuras 37, 38, 44, 45). De manera similar a lo antes mencionado para la cepa silvestre y el doble mutante, las células expresando la versión *ScTrk1* y K1147N (sustitución de residuo de aminoácido lisina por una asparragina) contenían alrededor de 80% del máximo de potasio cuando fueron incubadas cuatro horas (Figuras 43 y 44) o cultivadas toda la noche en 1 mM de KCl (Figura 49) y por otra parte, las células expresando la versión M1153R de Trk1 contenían alrededor del 57% de potasio cuando se incubaron cuatro horas en 1 mM de KCl (Figura 45) y 34% cuando fueron cultivadas a esta concentración durante toda la noche (Figura 49).



**Figura 49. Concentración interna de potasio en cepas con la versión *ScTRK1*, *K1147N* y *M1153R*.** Las cepas fueron cultivadas toda la noche a diferentes concentraciones externas de potasio. El estado estable en las concentraciones de las figuras 43, 44 y 45 se indican en cuadrados. *M1153R* no creció a 0,3 mM de KCl, lo que impidió medir las concentraciones internas de potasio. Los experimentos fueron repetidos al menos tres veces. Las barras de error corresponden a la desviación estándar.

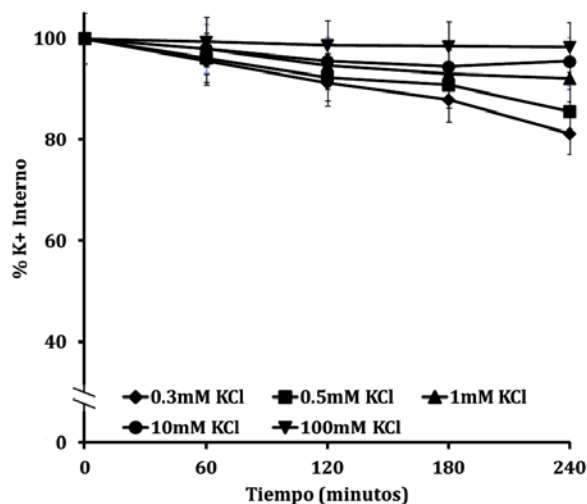
De manera similar, se realizó un experimento para determinar el volumen celular de las distintas versiones de *TRK1* en condiciones no limitantes de potasio (100 mM de KCl). En estas condiciones la versión *K1147N* presentó un volumen de 61 fL, la versión *ScTRK1* 60 fL y la versión *M1153R* un volumen de 57 fL, es decir, las dos primeras versiones de *TRK1* (*K1147N* y *ScTRK1*) se comportaron como la cepa silvestre, mientras que como se esperaba la versión *M1153R* presentó un volumen similar al doble mutante.

## 2.2. Efecto de *NchAK1*.

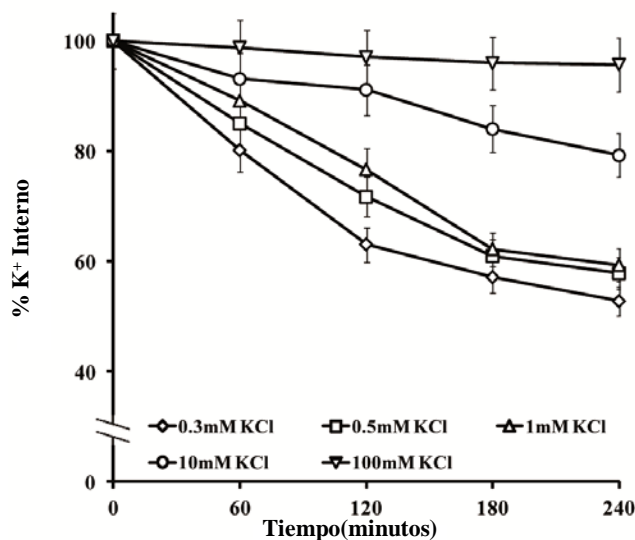
Para elucidar si el patrón presentado por *Trk* es específico para este transportador en *S. cerevisiae* o podría extrapolarse a cualquier levadura, se decidió estudiar el doble mutante *trk1,2* transformado con una versión del transportador de alta afinidad de *Neurospora crassa* (*NchAK1*). Los resultados para *NchAK1* (Figura 50), a diferencia del doble mutante *trk1,2* (la Figura 51 muestra el doble mutante con el plásmido vacío pYGEL15), no muestran una adaptación a las concentraciones externas, pues tanto a alto como a bajo potasio las concentraciones estacionarias internas fueron bastante similares. Estos resultados concuerdan con el hecho de que *HAK1* es un transportador de alta capacidad concentrativa en *N. crassa* (Haro *et al.*, 1999) y es propio de hongos que viven



en ambientes con una baja concentración de potasio, lo cual representa una ventaja ecológica, mientras que *S. cerevisiae* coloniza ambientes con altos contenidos de azúcar, los cuales presentan concentraciones altas de potasio.



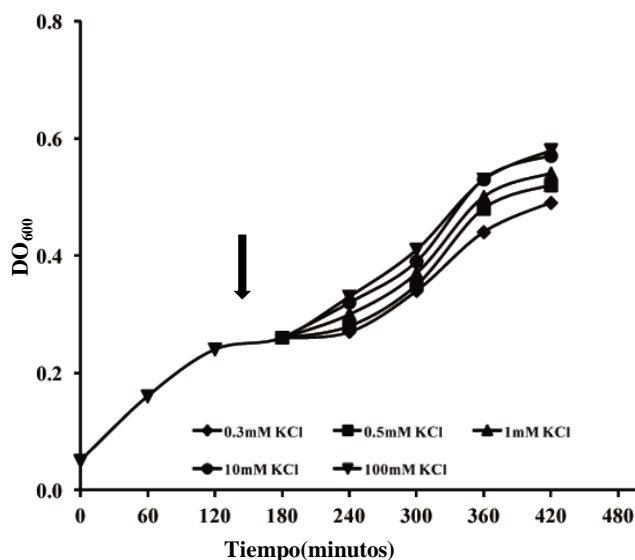
**Figura 50. Evolución del contenido de potasio en función de la concentración externa en el doble mutante *trk 1,2* transformado con una versión del transportador NcHAK1 de *Neurospora crassa*.** La cepa fue cultivada en 100 mM de KCl, luego resuspendida en diferentes concentraciones del catión y el proceso de adaptación fue seguido a lo largo del tiempo. Las barras de error corresponden a la desviación estándar.



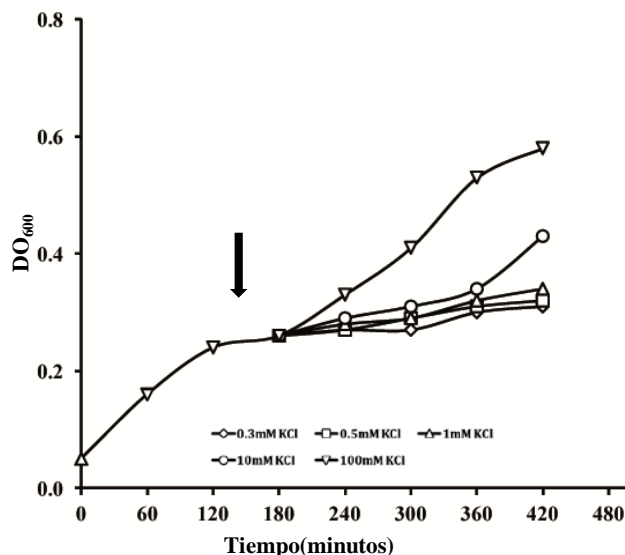
**Figura 51. Evolución del contenido de potasio en función de la concentración externa en el doble mutante *trk 1,2* transformado con una versión del plásmido vacío pYGE15.** La cepa fue cultivada en 100 mM de KCl, luego resuspendida en diferentes concentraciones del catión y el proceso de adaptación fue seguido a lo largo del tiempo. Las barras de error corresponden a la desviación estándar.

Se determinó la densidad óptica en el doble mutante *trk 1,2* transformado con una versión del transportador NcHAK1 de *Neurospora crassa* y también del doble mutante transformado con el plásmido vacío pYGE15 en las distintas concentraciones externas de potasio en relación al tiempo.

Los resultados determinaron que el doble mutante *trk 1,2* transformado con una versión del transportador NcHAK1 de *Neurospora crassa* presentó densidades ópticas muy similares para todas las concentraciones externas estudiadas (Figura 52), lo cual puede explicarse en función de la alta afinidad del transportador NcHAK por el potasio, incluso a bajas concentraciones de potasio, lo que influye en el crecimiento de la cepa. En relación al doble mutante transformado con el plásmido vacío pYGE15, su comportamiento fue similar al doble mutante *trk 1,2*, en cuanto a las densidades ópticas, lo que confirmó que el plásmido vacío pYGE15 no influyó en el fenotipo del doble mutante (Figura 53).

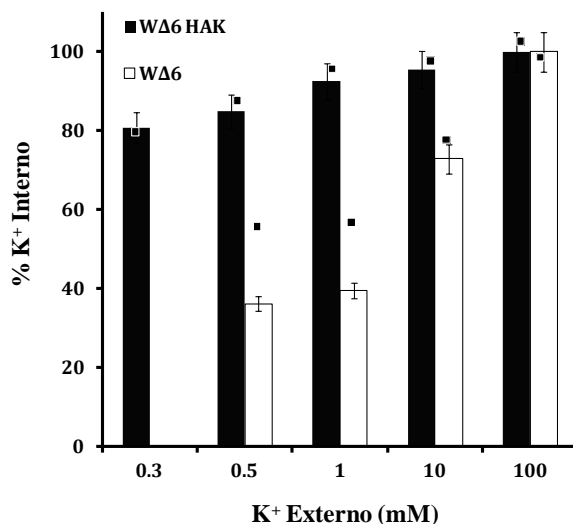


**Figura 52. Cambios en el crecimiento (D.O) en el doble mutante *trk 1,2* transformado con una versión del transportador NcHAK1 de *Neurospora crassa*.** La cepa fue cultivada en 100 mM de KCl, posteriormente resuspendida en diferentes concentraciones de potasio y paralelamente a la determinación del contenido interno, se cuantificó la densidad óptica ( $DO_{600}$ ). La flecha indica el punto en que la cepa fue resuspendida en las distintas concentraciones externas de potasio.



**Figura 53. Cambios en el crecimiento (D.O) en el doble mutante *trk 1,2* transformado con una versión del plásmido vacío pFL15.** La cepa fue cultivada en 100 mM de KCl, posteriormente resuspendida en diferentes concentraciones de potasio y paralelamente a la determinación del contenido interno, se cuantificó la densidad óptica (DO<sub>600</sub>). La flecha indica el punto en que la cepa fue resuspendida en las distintas concentraciones externas de potasio

También se llevó a cabo el experimento para determinar si las concentraciones estacionarias intracelulares dependían de las condiciones iniciales o estaban determinadas solamente por las concentraciones externas, las células se cultivaron toda la noche en medio YNB-F con diferentes concentraciones externas de potasio y luego se determinó el contenido de potasio, como se presenta en la Figura 54.



**Figura 54. Concentración interna de potasio en el doble mutante WΔ6 y WΔ6 transformado con una versión del transportador NchAK1 de *Neurospora crassa*.** Las cepas fueron cultivadas toda la noche a diferentes concentraciones externas de potasio. El estado estable en las concentraciones de las Figuras 50 y 51 se indican en cuadrados. El doble mutante no creció a 0,3 mM de KCl, lo que impidió medir las concentraciones internas de potasio. Los experimentos fueron repetidos al menos tres veces. Las barras de error corresponden a la desviación estándar.

Es interesante resaltar que en el doble mutante transformado con una versión del transportador NcHAK1 de *N. crassa*, la concentración intracelular de potasio fue aproximadamente de 600 nmol/mg de célula, cuando la concentración externa de potasio era 100 mM de KCl. En concentraciones bajas externas de potasio, la concentración interna fue proporcional a la externa, y de manera similar que en la cepa silvestre coincidió con los estados estacionarios (Figura 38). Interesantemente, a bajas concentraciones externas de potasio (0,3-1 mM), su contenido intracelular fue de 535 nmol/mg de célula, es decir, bastante similar al contenido intracelular de la cepa silvestre y el doble mutante *trk1,2*, cuando la concentración externa de potasio fue máxima (100 mM KCl), lo que confirma su comportamiento como un transportador de alta afinidad por el potasio, aún cuando la concentración externa del catión sea muy baja. Al comparar WΔ6 con doble mutante transformado con *HAK1*, se observó una evidente diferencia en su contenido intracelular de potasio, lo que confirma que el patrón presentado por *TRK* es específico para este transportador en *S. cerevisiae*.



## DISCUSIÓN

### 1. Distribución intracelular de potasio y sodio en *Saccharomyces cerevisiae*.

La homeostasis de potasio y sodio ha sido un proceso bien estudiado en levaduras durante años, los valores intracelulares de estos cationes en la cepa silvestre y mutantes de *Saccharomyces cerevisiae*, cultivados bajo diferentes condiciones han sido frecuentemente reportados (Ariño *et al.*, 2010). Sin embargo, mucha menos atención se ha dedicado a la localización subcelular de estos iones. La aproximación más utilizada con este propósito consiste en la utilización de diversas sustancias que permeabilizan específicamente la membrana plasmática. Como se mencionó anteriormente, aunque este procedimiento parecer ser demasiado simplista, diversos grupos han reportado mayores concentraciones de potasio en la vacuola que en el citoplasma (Okorokov *et al.*, 1980; Venema *et al.*, 2003; Montiel y Ramos, 2007). Los resultados del presente estudio en la cepa silvestre, cultivada en condiciones no limitantes de potasio encajan con esta idea. Por otra parte, los resultados muestran que los valores citoplasmáticos obtenidos utilizando citocromo C fueron significativamente más altos en comparación con los obtenidos en el aislamiento de organelos en células cultivadas en condiciones no limitantes de potasio y células ayunadas de este catión. Estos resultados sugieren una contaminación mucho más alta de la fracción citoplasmática procedente de otros organelos, cuando se utilizó el proceso de permeabilización de la membrana plasmática usando citocromo C.

También se ha demostrado en este trabajo que la presencia de cantidades significativas de potasio en el núcleo no puede ser ignorada, como fue reportado por Roomans y Sevés (Roomans y Sevés, 1976). De hecho, la principal contradicción entre los resultados de estos autores y los que usan el procedimiento de permeabilización de la membrana es el bajo contenido de cationes en vacuola señalado por Roomans y Sevés. En este sentido hay que tener presente que estos autores incubaron sus células en agua durante las 24 horas previas a la medida y que en esta investigación hemos medido bajos niveles de potasio en la vacuola de células ayunadas de potasio durante 4 horas.

En condiciones normales, las vacuolas son los organelos en los cuales se acumula grandes cantidades de potasio, y en contraste, el potasio citosólico es relativamente bajo. Sin embargo, las cantidades de potasio en el citosol parecen ser muy importantes para la fisiología celular, por ejemplo, regulación de la actividad enzimática

(Page y Di Cera, 2006), como se sugiere por la extraordinaria movilización de potasio vacuolar hacia el citosol durante el período de ayuno de este catión, con el fin de mantener los niveles constantes. Una pregunta que queda abierta es acerca del sustrato acumulado por la vacuola en células ayunadas con el objetivo de mantener el potencial osmótico, ya que además el contenido de potasio disminuye y las células pierden grandes cantidades de polifosfatos durante el proceso de ayuno de potasio (David Canadell y Joaquín Ariño. Comunicación personal).

En el caso de las células cultivadas en sodio, la distribución subcelular de este catión fue similar a la que se observó para el potasio, es decir, mayor cantidad del catión en la vacuola que en el citoplasma. Sin embargo, en este caso los niveles de sodio en el citosol se mantuvieron especialmente bajos, reforzando la idea de que el sodio es un elemento tóxico.

Los cuatro mutantes utilizados en el presente estudio carecen de genes muy diferentes, pero todos tienen en común una fisiología vacuolar defectuosa. Es importante señalar que todos ellos presentaron una distribución intracelular alterada de cationes. Los cuatro mutantes vacuolares contenían altas cantidades de potasio en el citosol y bajas cantidades del catión en la vacuola. Específicamente, tanto *nhx1* como *vnx1* fueron menos efectivos en la acumulación de potasio en la vacuola, mientras que *ptc1* y *vam6* mostraron un fenotipo menos severo, lo que confirma el papel específico de *Nhx1* y *Vnx1* en el transporte específico y distribución intracelular de cationes, validando nuestro procedimiento experimental. Nuestros resultados indican una acumulación vacuolar y citosólica defectuosa y sugieren la ausencia de un posible mecanismo de detección que regularía el transporte de potasio del medio externo al citoplasma. Además, como claramente muestran las gráficas tipo radial, las cuatro cepas mutantes mostraron una respuesta diferente frente al ayuno de potasio en comparación con la cepa silvestre. Por otra parte, ninguna de estas cepas fue capaz de mantener las bajas concentraciones citosólicas de sodio que se midieron en la cepa silvestre, aunque su sensibilidad a sodio varía enormemente de un mutante a otro. Este comportamiento ilustra la complejidad de las dianas de sensibilidad a sodio. En nuestro estudio, el mutante *vnx1* no fue sensible a sodio, lo cual concuerda con trabajos previos (Cagnac *et al.*, 2007) y los mutantes *ptc1* y *vam6* mostraron una sensibilidad moderada. A este respecto, vale la pena mencionar que en dos amplios estudios genómicos, se propuso que el crecimiento de los mutantes *vam6* no estaba afectado (Gustavsson *et al.*, 2008) o muy ligeramente inhibido por sodio (Warringer *et al.*, 2003). Finalmente, la cepa más susceptible, el mutante *nhx1*, acumuló

más sodio intracelular que la cepa silvestre, el ratio potasio/sodio fue más bajo y además, un importante porcentaje de este sodio estaba en el citosol, lo cual muy probablemente está relacionado con su sensibilidad a este catión. En este punto vale la pena comentar que Nhx1 regula la fusión de membranas en las vesículas endosomales y la acidificación del citosol y el lumen vacuolar (Qiu y Fratti, 2010). En resumen, aunque la razón subyacente puede ser diferente dependiendo de la mutación, el hecho es que todos los mutantes mostraron un contenido vacuolar de cationes alterado y problemas para adaptarse a cambios en el medio externo.

Desde un punto de vista general, el contenido de cationes en otros organelos como la mitocondria, el aparato de Golgi y el retículo endoplasmático fue relativamente bajo y constante, bajo las diferentes condiciones estudiadas en esta investigación. No podemos descartar completamente la posibilidad de que se pierda algo de potasio durante la homogeneización en el caso de estos organelos celulares; sin embargo, parece razonable esperar bajas cantidades de potasio en ellos y, de esta manera, los resultados del presente estudio parecen ser coherentes con esta idea y con el conjunto de datos obtenidos. La posibilidad de cantidades significativas de potasio en el núcleo de las levaduras, generalmente se ha pasado por alto, aunque Roomans y Sevés lo mencionaron (Roomans y Sevés, 1976) en su artículo pionero de 1976. En este estudio se muestra que el núcleo de la cepa silvestre contiene aproximadamente un tercio del potasio y sodio intracelular y que esta cantidad se mantiene bastante constante en todos los mutantes vacuolares estudiados y es independiente de las condiciones externas de potasio (ayuno de potasio o presencia de sodio). Aparentemente, no importa si la célula utiliza potasio o sodio, en las células cultivadas en sodio, tanto el potasio como el sodio están presentes en el núcleo. Los poros nucleares son lo suficientemente grandes para permitir el paso de potasio y sodio; sin embargo, nuestras medidas sugieren que una importante cantidad de estos cationes se encuentran en la fracción nuclear y es tentador proponer que estos cationes pueden ser usados para neutralizar parte de las cargas negativas en este organelo, como ha sido previamente propuesto en células de mamíferos donde el potasio y el sodio han sido directamente implicados en la neutralización electrostática en la estructura del cromosoma, así como en la interacción funcional con las proteínas no histonas (Strick *et al.*, 2001). La Figura 55 representa un modelo esquemático de la distribución intracelular de potasio en condiciones no limitantes (50 mM KCl) del catión y su variación luego de un ayuno de potasio (cuatro horas) en la cepa silvestre. Se observa un flujo del catión entre la vacuola y el citoplasma al pasar de una condición a otra de cultivo, e incluso una disminución del tamaño de la vacuola tras el ayuno como



consecuencia de la pérdida de potasio; el núcleo y los demás organelos estudiados mantienen en términos generales, sus porcentajes de potasio invariables.

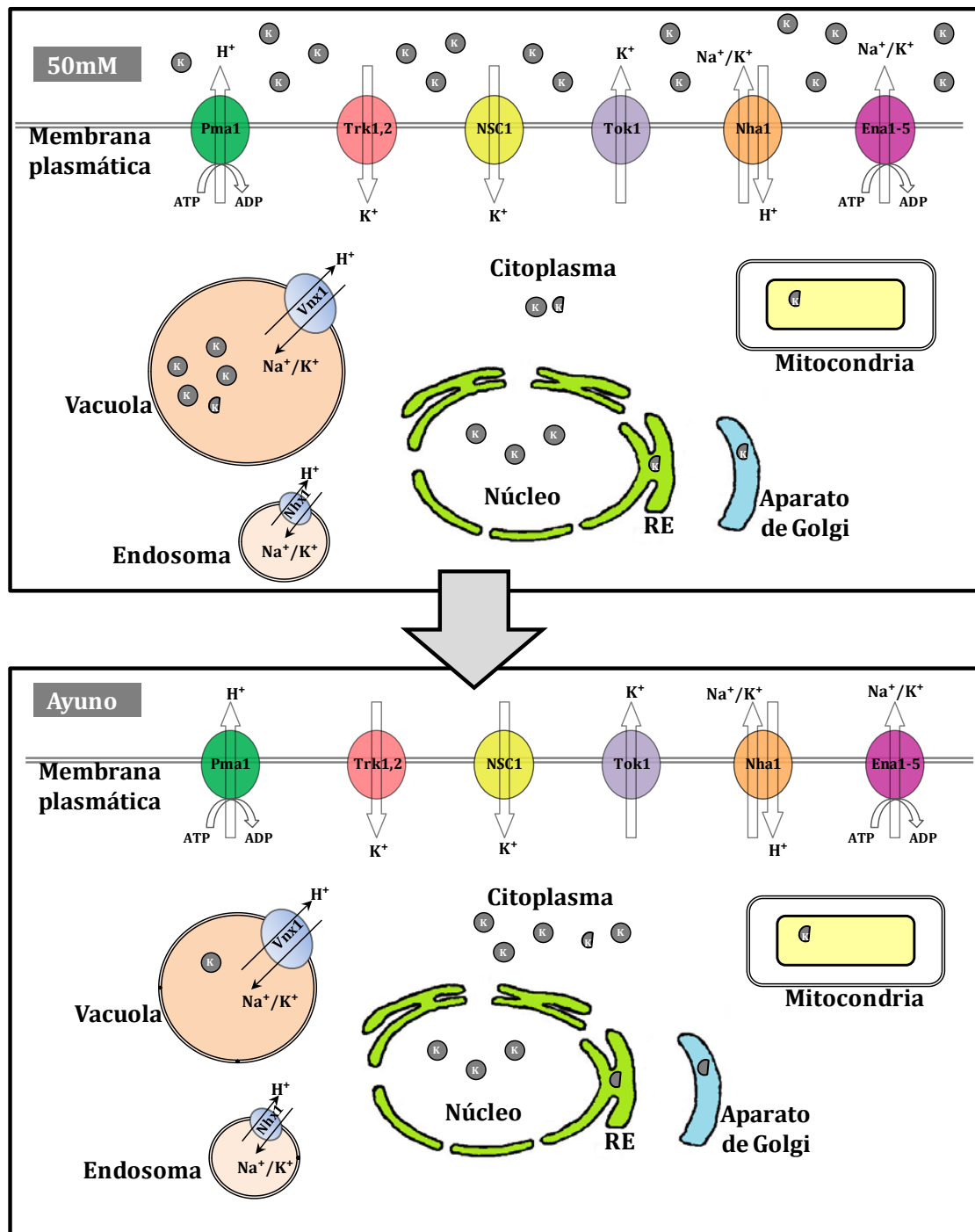


Figura 55. Modelo para el flujo y distribución intracelular de potasio en condiciones no limitantes y de ayuno del catión para la cepa silvestre en *S. cerevisiae*. Cada  $\textcircled{K}$  corresponde a un 10% y  $\textcircled{K}$  corresponde a 5% del potasio intracelular.

Dos diferentes modos de transporte de potasio existen en *S. cerevisiae* (Ramos y Rodríguez-Navarro, 1986; Rodríguez-Navarro 2000). El modo de baja afinidad tiene un  $K_m$  en el rango milimolar y es observado en células cultivadas sin limitaciones de potasio, mientras que el modo de alta afinidad con un  $K_m$  en el rango micromolar está en operación, cuando las células son sometidas a un ayuno de potasio o son cultivadas en presencia de sodio. La entrada activa de potasio es mediada por los transportadores Trk1 y Trk2, localizados en la membrana plasmática, siendo Trk1 el más importante (Ko *et al.*, 1990; Ramos *et al.*, 1994, Vidal *et al.*, 1995). La delección los genes *TRK1* y *TRK2* en cepas con diferentes fondos genéticos y bajo diferentes condiciones experimentales (Ko *et al.*, 1990; Ramos *et al.*, 1994; Madrid *et al.*, 1998; Bertl *et al.*, 2003), siempre resulta en la inhibición del crecimiento a bajas concentraciones de potasio, cierta hiperpolarización de la membrana plasmática y la observación de un transporte de potasio residual ectópico.

Por ello y aplicando la metodología empleada para el estudio de la distribución de potasio en la cepa silvestre, se decidió estudiar la misma en el mutante *trk1,2* en 50 mM y 5 mM de KCl y en las fases de crecimiento exponencial y estacionaria. El contenido intracelular total de potasio del doble mutante *trk1,2* fue menor cuando fue cultivado en 5 mM de KCl (concentración limitante de potasio para esta cepa, en fase logarítmica). En fase estacionaria, el contenido intracelular del catión fue mayor en el mutante. Es interesante que los valores en nmoles de  $K^+$ /mg de célula de la fase estacionaria coinciden con los cuantificados en el ayuno de potasio (Navarrete *et al.*, 2010), para ambas cepas lo que refuerza las similitudes entre el estrés por ayuno de potasio y la fase estacionaria, en la que disponibilidad de nutrientes es limitada. En este sentido, recientes estudios a nivel proteómico señalan una disminución general del contenido de proteínas durante el ayuno, que es especialmente drástico en el doble mutante *trk1,2*, como es el caso de un importante número de proteínas involucradas en la glucólisis (Gelís *et al.*, 2012). Se decidió estudiar la distribución en vacuola y el núcleo, ya que éstos fueron importantes lugares de acumulación de potasio. Hay que destacar que el doble mutante cultivado en 5 mM de KCl acumuló menos potasio en la vacuola, núcleo y “citoplasma” (valor deducido y que incluye otros organelos como el retículo endoplasmático, aparato de Golgi y mitocondrias) en fase logarítmica; mientras que en fase estacionaria retuvo más potasio en los mismos, presentando una distribución diferente a la cepa control, sugiriendo que a menor concentración externa del catión el doble mutante, de alguna manera, retiene más potasio en sus principales organelos en respuesta a su transporte deficitario del mismo.

Por otra parte, el doble mutante acumuló algo menos sodio en la vacuola que la cepa control, lo que implica más sodio en el “citoplasma” y mayor efecto tóxico para célula y probablemente una homeostasis menos efectiva.

Nuestros primeros resultados demostraron que el potasio vacuolar se moviliza hacia el citosol durante las horas de ayuno de potasio. Para responder a la pregunta sobre la rapidez con que la célula detecta la posterior presencia de potasio en el medio y como lo moviliza, realizamos un experimento en el que tras crecer sin limitación de potasio y ayunar las células, se les dio un pulso de 10 mM KCl durante 20 minutos y se estudió el potasio total y el vacuolar en la cepa silvestre, el mutante *trk1,2* y el mutante del transportador vacuolar *Nhx1* (Figuras 32 y 33). Los resultados permiten concluir que, cuando el potasio está disponible y la levadura posee la capacidad correspondiente (cepa silvestre), la célula detecta el potasio extracelular y no solo lo acumula en el citoplasma, sino que lo traslada a la vacuola aparentemente de manera inmediata sugiriendo mecanismos muy rápidos y eficaces de control de los flujos. Ninguno de los dos mutantes estudiados en este ensayo pudo culminar este proceso de manera tan eficiente puesto que el mutante *trk1,2* apenas pudo tomar potasio del medio y el mutante *nhx1* carece del correspondiente transportador en el tonoplasto.

Al medir el tamaño celular y vacuolar ( $\mu\text{m}$ ) en condiciones no limitantes de potasio para la cepa silvestre y el doble mutante *trk1,2*, no se observaron diferencias significativas a nivel celular, lo que concuerda con los datos de volumen (fL) reportados (Navarrete *et al.*, 2010), sin embargo la vacuola de la cepa silvestre fue de mayor tamaño. Luego del ayuno de cuatro horas, ambas cepas disminuyeron significativamente su tamaño celular y vacuolar, siendo de mayor tamaño la cepa silvestre, esto concuerda con Navarrete y colaboradores (Navarrete *et al.*, 2010). Hay que resaltar que tras la adición de 10 mM de KCl la cepa silvestre aumentó su tamaño incluso por encima del registrado cuando creció en 50 mM de KCl; el doble mutante no lo hizo. Estos datos sugieren que un período de tiempo relativamente corto la cepa silvestre tiende a acumular intracelularmente potasio incluso por encima de sus valores iniciales, probablemente estos se estabilicen hasta alcanzar los valores iniciales y de esta manera mantener la homeostasis del catión, el doble mutante, como hemos mencionado anteriormente, apenas tomó potasio en esas condiciones y, consecuentemente, no incrementó su volumen. En su conjunto, los resultados de tamaño celular concuerdan con los datos de contenido intracelular del catión obtenidos en la Figura 32.

En definitiva, es importante destacar que se ha establecido y optimizado un protocolo para determinar la localización subcelular de cationes en levaduras, el cual puede ser utilizado para analizar la cepa silvestre bajo diferentes condiciones externas y, además, múltiples tipos de mutantes diferentes afectados en la homeostasis de cationes y cuyas alteraciones no se comprenden suficientemente hoy en día.

## **2. Papel de la proteína Trk1 en la adaptación frente a cambios en los niveles externos de potasio.**

En un intento de entender el funcionamiento coordinado de la regulación de la homeostasis iónica en *S. cerevisiae*, se ha publicado recientemente un modelo matemático (Ke *et al.*, 2013). Los autores predicen el funcionamiento de diversas rutas y transportadores, después del estrés provocado por perturbaciones, sin embargo encontraron inconsistencias entre los datos experimentales y el modelo predictivo en el caso de Trk, ya que el modelo predice que, por ejemplo, en la presencia de sodio, se incrementa la actividad de Trk aumentando el ratio sodio/potasio lo cual contradice el papel conocido de Trk en la discriminación frente a la entrada de sodio a la célula. Este hecho es explicado por los autores sobre la base de una representación excesivamente simplificada del funcionamiento del sistema Trk y sirve para ilustrar la complejidad de la homeostasis de potasio. Además, el uso de un nuevo método de inferencia, muestra que los principales reguladores bajo condiciones de ayuno de potasio son el flujo de protones generado como consecuencia de cambios en las concentraciones de potasio y que la regulación de los principales sistemas de potasio (Trk1,2 y Nha1) en la membrana plasmática no son suficientes para lograr alcanzar la homeostasis (Kahm *et al.*, 2012). También se reportó en este trabajo que al resuspender la cepa silvestre en un medio con diferentes concentraciones externas de potasio, la salida de potasio y las concentraciones estacionarias internas son diferentes para los distintos niveles externos del catión (Kahm *et al.*, 2012), por lo tanto esto indica que este proceso no está regulado por un control integral lo que significaría una adaptación perfecta, donde la entrada en el estado estable de potasio es independiente de la concentración externa del catión (Yi *et al.*, 2000).

En esta tesis se ha extendido ese tipo de estudio a mutantes en el principal sistema de transporte de la membrana plasmática. Al trabajar con un fondo genético diferente, primero confirmamos los resultados de Kahm *et al* (2012) en la cepa silvestre W303. Tanto la cepa silvestre como el doble mutante *trk1,2*, perdieron potasio cuando se

cultivaron en 100 mM de KCl y luego se transfirieron a bajas concentraciones externas de potasio. Sin embargo, la dinámica del proceso de la pérdida de potasio pareció ser claramente diferente en las dos cepas. En la cepa silvestre, se alcanzó un nivel intracelular estable que fue proporcional a la concentración externa de potasio, mientras que en el doble mutante el proceso de pérdida de potasio no fue afectado a diversas concentraciones bajas del catión en un amplio rango de concentraciones externas, probablemente debido a su capacidad de transporte defectuosa (comparar el proceso entre las concentraciones de 0,3 y 1 mM de KCl). Esto es relevante, ya que cuando el potasio externo no fue lo suficientemente alto, los mutantes no fueron capaces de adaptar el contenido interno al externo. Sin embargo, cuando el rango de concentraciones externas experimentó un incremento, el doble mutante respondió de una manera cualitativamente comparable a la de la cepa silvestre y fue capaz de modular su contenido interno de potasio de acuerdo a las concentraciones externas. La no adaptación a cambios en la concentración de potasio extracelular hubiese significado que el doble mutante no podría hacer frente a una disminución en la concentración externa del catión y eventualmente sería incapaz de crecer y moriría. En conclusión, y de manera similar a la cepa silvestre, el doble mutante *trk1,2* muestra también una adaptación imperfecta a los cambios en los valores de potasio externos, pero esta adaptación es cuantitativamente diferente ya que necesita concentraciones más altas para responder.

Los resultados obtenidos a partir de experimentos utilizando cepas obtenidas por Haro y Rodríguez-Navarro (2003), no indican la existencia de funciones específicas o muy bien diferenciadas (transporte de potasio versus señalización/regulación del estado estable) en Trk1 o al menos en diferentes regiones de la hélice M2<sub>D</sub> (que se caracteriza por poseer muchos residuos de aminoácidos cargados positivamente, los cuales muy probablemente forman parte del poro del transportador Trk1 y que interactúan con los segmentos P). Se estudiaron dos mutaciones de *TRK1*, M1153R (sustitución de residuo de aminoácido de metionina por un residuo de aminoácido de arginina) K1147N (sustitución de residuo de aminoácido lisina por una asparragina). Como se esperaba, cuando el doble mutante fue transformado con un plásmido que tenía insertado *TRK1*, el mutante se comportó como la cepa silvestre. Adicionalmente, una mutación en un residuo de aminoácido específico que afectó muy significativamente la capacidad de transporte hizo que la dinámica de adaptación del nivel de potasio estable intracelular fuera muy similar a la del doble mutante *trk1,2*. Por otra parte, una mutación en el mismo motivo de la proteína que afectó ligeramente el transporte, lo hizo de igual manera a la dinámica de la pérdida de potasio y alestablecimiento de niveles intracelulares estables de potasio

(Figura 44) siendo el comportamiento comparable al de la cepa silvestre. Estos resultados sugieren, que no hay procesos bien diferenciados de transporte y señalización de un estado estable en diferentes regiones de la proteína Trk1 y que las alteraciones en la señalización para alcanzar el estado estable en respuesta a cambios en los valores de potasio del medio son solamente una consecuencia de un problema en la capacidad de transporte. En consecuencia, aunque siendo muy relevante para el ajuste del potasio interno, proponemos que Trk1 no tiene funciones adicionales de señalización, ni como un sensor específico. Esta idea fue reforzada por el hecho de que NcHaK1, un transportador de potasio que no pertenece a la familia TRK, también reprodujo el patrón de comportamiento y adaptación que encontramos en la cepa silvestre, aunque con características cuantitativas diferentes que concuerdan las constantes de transporte de alta afinidad reportadas para este transportador (Haro *et al.*, 1999; Rivetta *et al.*, 2013).

Los resultados de la medida de potencial relativo de membrana y las pruebas de sensibilidad a drogas (resultados obtenidos por el grupo del Prof. Ramos), junto con los resultados de Kahm y colaboradores (Kahm *et al.*, 2012), encajan con la idea de que la actividad del sistema Trk está conectada a Pma1. Una imagen lógica para explicar esta situación podría ser la siguiente: cuando las células son cultivadas en una alta concentración de potasio y resuspendidas en bajas concentraciones del catión (0,3-0,5 mM), el flujo de potasio en primera instancia va hacia afuera de la célula, y entonces después de un período de tiempo, este es reabsorbido y la célula alcanza un estado de equilibrio entre la concentración externa e interna del catión. Este comportamiento parece ser consistente con la afirmación de que el aumento de la hiperpolarización de la membrana plasmática ayuda a las células a retener el potasio. Esta reabsorción de potasio a concentraciones externas bajas no es efectiva en los mutantes *trk1,2* y es lógico pensar que esta cepa permanece más hiperpolarizada que la cepa silvestre. En el estudio de Kahm y colaboradores (Kahm *et al.*, 2012), fue observado para la cepa silvestre y para el doble mutante *trk1,2*, que la ATPasa Pma1 incrementa su actividad después de la resuspensión en bajas concentraciones de potasio. En el mismo trabajo, también fue observado un incremento en la expresión del gen de la anhidrasa carbónica. Es probable que este aumento suministrara un sustrato (protones) a la ATPasa para hiperpolarizar a la membrana plasmática. Como consecuencia inmediata, se produciría la reabsorción de potasio por medio del sistema *Trk1,2*. Si este sistema de transporte está ausente o no es funcional, el efecto de Pma1 permanece, pero la energía libre almacenada en el potencial de membrana no puede ser utilizada para la reabsorción

de potasio, lo que genera una hiperpolarización de la membrana plasmática y un aumento en la sensibilidad a drogas catiónicas.

En resumen, aunque actualmente carecemos de los detalles precisos sobre los mecanismos exactos que expliquen el aumento del flujo de protones y la consecuente hiperpolarización de la membrana plasmática, sabemos que Pma1 puede ser regulada por una quinasa mediante fosforilación (Lecchi *et al.*, 2007) y que el gen *NCE103* que codifica para la anhidrasa carbónica es regulado transcripcionalmente (Amoroso *et al.*, 2005; Kahm *et al.*, 2012).

En su conjunto, las alteraciones en la señalización y establecimiento de un estado intracelular de potasio estable que describimos en los mutantes que carecen del sistema de transporte de potasio Trk, así como, la sensibilidad a drogas catiónicas o la hiperpolarización de la membrana plasmática, estarían directamente relacionados con la capacidad de transporte de la célula y podrían ser explicados en base a una consecuencia de un proceso de transporte defectuoso.

## CONCLUSIONES

1. Las vacuolas son los organelos en los cuales se acumulan la mayor parte del potasio y el sodio celular.
2. El citosol contiene cantidades relativamente bajas de estos cationes (especialmente sodio). Sin embargo, estas concentraciones se mantienen muy constantes durante el proceso de ayuno de potasio, para lo cual el potasio vacuolar es movilizado hacia el citosol.
3. De igual manera, cuando hay de nuevo potasio disponible, las células lo toman y lo acumulan inmediatamente en la vacuola.
4. La distribución intracelular de cationes está alterada en cuatro mutantes vacuolares que, siendo muy diferentes, muestran defectos en la fisiología vacuolar (*nhx1*, *vnx1*, *ptc1*, *vam6*).
5. Todas las cepas estudiadas mantuvieron cantidades importantes de potasio y sodio en el núcleo. El contenido de cationes en la mitocondria, el aparato de Golgi y el retículo endoplasmático fue relativamente bajo y constante en cualquiera de las diferentes condiciones estudiadas.
6. Durante la fase logarítmica de crecimiento, el mutante *trk1,2*, cultivado en condiciones limitantes de potasio, acumuló menos cantidad del catión que la cepa silvestre en vacuola, núcleo o citoplasma. En cambio, durante la fase estacionaria retuvo más potasio que la cepa silvestre.
7. El doble mutante *trk1,2* es capaz de adaptar su contenido interno de potasio a cambios en el medio externo. De igual manera que sucede en la cepa silvestre, se trata de una adaptación imperfecta (non perfect adaptation) pero cuantitativamente diferente ya que necesita concentraciones más altas de potasio extracelular para responder.
8. Proponemos que, aun siendo muy relevante en el tema de la homeostasis de potasio, Trk1 no tiene funciones de señalizaciones independientes o adicionales a la de transporte.





## Bibliografía

- Amoroso, G., L. Morell-Avrahov, D. Müller, K. Klug, D. Sültemeyer. 2005. The gene *NCE103* (YNL036w) from *Saccharomyces cerevisiae* encodes a functional carbonic anhydrase and its transcription is regulated by the concentration of inorganic carbon in the medium. *Mol. Microbiol.* **56**:549–558.
- Antebi, A., G. Fink. 1992. The yeast Ca<sup>2+</sup>-ATPase homologue, PMR1, is required for normal Golgi function and localizes in novel Golgi-like distribution. *Mol. Biol. Cell.* **3**:633-654.
- Ariño, J., E. Aydar, S. Drulhe, D. Ganser, J. Jorrín, M. Kahm, F. Krause, S. Petrežsélyová, L. Yenush, O. Zimmermannova, G.P.H. Van Heusden, M. Kschischo, J. Ludwig, C. Palmer, J. Ramos y H. Sychrová. 2013. Systems Biology of Monovalent Cation Homeostasis in Yeast: The Translucent Contribution. (submitted).
- Ariño, J., A. Casamayor, A. González. 2011. Type 2C protein phosphatases. in fungi. *Eukaryot.Cell.***10**: 21-33.
- Ariño, J., J. Ramos, H. Sychrová, H. 2010. Alkali metal cation transport and homeostasis in yeasts. *Microbiol. Mol. Rev.***74**:95-120.
- Banuelos, M.A., F.J. Quintero, A. Rodríguez-Navarro. 1995. Functional expression of the ENA1 (PMR2) ATPase of *Saccharomyces cerevisiae* in *Schizosaccharomyces pombe*. *Biochim. Biophys. Acta* **1229**: 233-238
- Banuelos, M. A., A. Rodríguez-Navarro. 1998. P-type ATPases mediate sodium and potassium effluxes in *Schwanniomyces occidentalis*. *J. Biol.Chem.* **273**:1640–1646.
- Banuelos, M. A., H. Sychrová, C. Bleykasten-Grosshans, J. L. Souciet, S. Potier. 1998. The Nha1 antiporter of *Saccharomyces cerevisiae* mediates sodium and potassium efflux. *Microbiology* **144**:2749–2758.
- Barreto, L., D. Canadell, S. Petrežsélyová, C. Navarrete, L. Maresová, J. Pérez-Valle, R. Herrera, I. Olier, J. Giraldo, H. Sychrová, L. Yenush, J. Ramos, J. Ariño. 2011. A genomewide screen for tolerance to cationic drugs reveals genes important for potassium homeostasis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukariot. Cell.* **10**: 1241-1250.
- Benito, B., B. Garciadeblas, A. Rodríguez-Navarro. 2002. Potassium- or sodium-efflux ATPase, a key enzyme in the evolution of fungi. *Microbiology* **148**:933–941.
- Benito, B., B. Garciadeblas, P. Schreier, A. Rodríguez-Navarro. 2004. Novel p-type ATPases mediate high-affinity potassium or sodium uptake in fungi. *Eukaryot. Cell* **3**:359–368.
- Bertl, A., H. Bihler, J. D. Reid, C. Kettner, C. L. Slayman. 1998. Physiological characterization of the yeast plasma membrane outward rectifying channel, DUK1 (TOK1), in situ. *J. Membr. Biol.* **162**:67–80.
- Bertl, A., J. Ramos, J. Ludwig, H. Lichtenberg-Frate, J. Reid, H. Bihler, F. Calero, P. Martínez, P. O. Ljungdahl. 2003. Characterization of potassium transport in wild-type and isogenic yeast strains carrying all combinations of *trk1*, *trk2* and *tok1* null mutations. *Mol. Microbiol.* **47**:767–780.

- Bertl, A., C. L. Slayman, D. Gradmann. 1993. Gating and conductance in an outward-rectifying K<sup>+</sup> channel from the plasma membrane of *Saccharomyces cerevisiae*. J. Membr. Biol. **132**:183–199.
- Bihler, H., R. F. Gaber, C. L. Slayman, A. Bertl. 1999. The presumed potassium carrier Trk2p in *Saccharomyces cerevisiae* determines an H<sup>+</sup> dependent, K<sup>+</sup>-independent current. FEBS Lett. **447**:115–120.
- Bihler, H., C. L. Slayman, A. Bertl. 1998. NSC1: a novel high-current inward rectifier for cations in the plasma membrane of *Saccharomyces cerevisiae*. FEBS Lett. **432**:59–64.
- Bihler, H., C. L. Slayman, A. Bertl. 2002. Low-affinity potassium uptake by *Saccharomyces cerevisiae* is mediated by NSC1, a calcium-blocked nonspecific cation channel. Biochim.Biophys.Acta. **1558**:109–118.
- Blatt, M., Slayman, C. 1987. Role of “active” potassium transport in the regulation of cytoplasmic pH nonanimal cells. Proc. Natl. Acad. Sci. **84**: 2737-2741.
- Bonangelino, C.J., E.M Chávez, J.S. Bonifacino. 2002. Genomic screen for vacuolar protein sorting genes in *Saccharomyces cerevisiae*. Mol. Biol Cell. **13**: 2486-2501.
- Borst-Pauwels, G. W. 1981. Ion transport in yeast. Biochim. Biophys. Acta **650**:88–127.
- Bowers, K., B. P. Levi, F. I. Patel, T. H. Stevens. 2000. The sodium/ proton exchanger Nhx1p is required for endosomal protein trafficking in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Mol. Biol. Cell **11**:4277–4294.
- Bradford, M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. **72**: 248-254
- Brett, C. L., M. Donowitz, R. Rao. 2005. Evolutionary origins of eukaryotic sodium/proton exchangers. Am. J. Physiol. Cell Physiol. **288**:223–239.
- Brett, C. L., D. N. Tukaye, S. Mukherjee, R. Rao. 2005. The yeast endosomal Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger Nhx1 regulates cellular pH to control vesicle trafficking. Mol. Biol. Cell **16**:1396–1405.
- Cagnac, O., M.N. Aranda-Sicilia, M. Leterrier, M.P. Rodríguez-Rosales, K. Venema. 2010. Vacuolar cation/H<sup>+</sup> antiporters of *Saccharomyces cerevisiae*. J. Biol. Chem. **285**: 33914-33922.
- Cagnac, O., M. Leterrier, M. Yeager, E. Blumwald. 2007. Identification and characterization of Vnx1p, a novel type of vacuolar monovalent cation/ H<sup>+</sup> antiporter of *Saccharomyces cerevisiae*. J. Biol. Chem. **282**:24284–24293.
- Calahorra, M., G. A. Martinez, A. Hernández-Cruz, A. Pena. 1998. Influence of monovalent cations on yeast cytoplasmic and vacuolar pH. Yeast **14**:501–515.
- Casado, C., L. Yenush, C. Melero, M. Ruíz, R. Serrano, J. Pérez-Valle, J. Ariño, J. Ramos. 2010. Regulation of Trk-dependent potassium transport by calcineurin pathway involves the Hal5 kinase. FEBS Lett. **584**:2415-2420.

Catty, P., A. de Kerchove d'Exaerde, A. Goffeau. 1997. The complete inventory of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* P-type transport ATPases. *FEBS Lett.* **409**:325–332.

Clotet, J., E. Gari, M. Aldea, J. Ariño. 1999. The yeast ser/thr phosphatases sit4 and ppz1 play opposite roles in regulation of the cell cycle. *Mol. Cell. Biol.* **19**:2408–2415.

Daum, G., F. Paltauf. 1984. Isolation and partial characterization of a phospholipid transfer protein from yeast cytosol. *Biochim.Biophys.Acta.* **794**: 385-391

De Hertogh, B., F. Hancy, A. Goffeau, P. V. Baret. 2006. Emergence of species-specific transporters during evolution of the hemiascomycete phylum. *Genetics* **172**:771–781.

de Nadal, E., F. Calero, J. Ramos, J. Ariño . 1999. Biochemical and genetic analyses of the role of yeast casein kinase 2 in salt tolerance. *J. Bacteriol.* **181**: 6456-6462.

de Nadal, E., J. Clotet, F. Posas, R. Serrano, N. Gómez, J. Ariño. 1998. The yeast halotolerance determinant Hal3p is an inhibitory subunit of the Ppz1p Ser/Thr protein phosphatase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**:7357–7362.

Depierre, J., G. Dallner, 1975. Structural aspects of the membrane of the endoplasmic reticulum. *Biochim.Biophys. Acta.* **415**: 411-472.

Dibrov, P., L. Fliegel. 1998. Comparative molecular analysis of Na<sup>+</sup> / H<sup>+</sup> exchangers: a unified model for Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiport? *FEBS Lett.* **424**:1–5.

Dichtl, B., A. Stevens, D. Tollervy. 1997. Lithium toxicity in yeast is due to the inhibition of RNA processing enzymes. *EMBO J.* **16**:7184–7195.

Erez, O., C. Kahana. 2001. Screening for modulators of spermine tolerance identifies Sky1, the SR protein kinase of *Saccharomyces cerevisiae*, as a regulator of polyamine transport and ion homeostasis. *Mol. Cell. Biol.* **21**:175–184.

Fairman, C., X. Zhou, C. Kung. 1999. Potassium uptake through the TOK1 K<sup>+</sup> channel in the budding yeast. *J. Membr. Biol.* **168**:149–157.

Fell, G.L., A.M. Munson, M.A. Croston, A.G. Rosenwald. 2011. Identification of Yeast Genes Involved in K<sup>+</sup> Homeostasis: Loss of Membrane Traffic Genes Affects K<sup>+</sup> Uptake. *G3 (Bethesda)*. **1**: 43-56

Fernandes, A. R., I. Sa-Correia. 2003. Transcription patterns of PMA1 and PMA2 genes and activity of plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase in *Saccharomyces cerevisiae* during diauxic growth and stationary phase. *Yeast* **20**: 207–219.

Ferrando, A., S. J. Kron, G. Ríos, G. R. Fink, R. Serrano. 1995. Regulation of cation transport in *Saccharomyces cerevisiae* by the salt tolerance gene HAL3. *Mol. Cell. Biol.* **15**: 5470–5481.

Fliegel, L. 2005. Identification of conserved polar residues important for salt tolerance by the Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger of *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol. Cell. Biochem.* **268**:83–92.

Flis, K., A. Hinzpeter, A. Edelman, A. Kurlandzka. 2005. The functioning of mammalian ClC-2 chloride channel in *Saccharomyces cerevisiae* cells requires an increased level of Kha1p. *Biochem. J.* **390**:655–664.

- Forment, J., J. M. Mulet, O. Vicente, R. Serrano. 2002. The yeast SR protein kinase Sky1p modulates salt tolerance, membrane potential and the Trk1,2 potassium transporter. *Biochim.Biophys. Acta* **1565**:36–40.
- Froschauer, E., K. Nowikovsky, R. J. Schweyen. 2005. Electroneutral K<sup>+</sup> / H<sup>+</sup> exchange in mitochondrial membrane vesicles involves Yol027/ Letm1 proteins. *Biochim.Biophys.Acta*.**1711**:41–48.
- Gaber, R. F., C. A. Styles, 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.
- Garciadeblas, B., F. Rubio, F. J. Quintero, M. A. Banuelos, R. Haro, A. Rodríguez-Navarro. 1993. Differential expression of two genes encoding isoforms of the ATPase involved in sodium efflux in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Gen. Genet.* **236**:363–368.
- Gasch, A. P., P. T. Spellman, C. M. Kao, O. Carmel-Harel, M. B. Eisen, G. Storz, D. Botstein, P. O. Brown. 2000. Genomic expression programs in the response of yeast cells to environmental changes. *Mol. Biol. Cell* **11**: 4241–4257.
- Goffeau, A., B. G. Barrell, H. Bussey, R. W. Davis, B. Dujon, H. Feldmann, F. Galibert, J. D. Hoheisel, C. Jacq, M. Johnston, E. J. Louis, H. W. Mewes, Y. Murakami, P. Philippsen, H. Tettelin, S. G. Oliver. 1996. Life with 6000 genes. *Science*.**274**:546, 563–567.
- Gelis, S., M. Curto, L. Valledor, A. González, J. Ariño, J. Jorrín, J. Ramos. 2012. Adaptation to potassium starvation of wild-type and K (+) transport mutant (trk1,2) of *Saccharomyces cerevisiae*: 2-dimensional gel electrophoresis-based proteomic approach. *Microbiologyopen* **1**: 182-193.
- Gómez, M. J., K. Luyten, J. Ramos. 1996. The capacity to transport potassium influences sodium tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol. Lett.* **135**:157 160.
- González, A., C. Casado, S. Petrežsélyová, A. Ruíz J. Ariño. 2013. Molecular analysis of a conditional *hal3 vhs3* yeasts mutant link potassium homeostasis flocculation and invasiveness. *Fungal Genetics and Biology.* **53** : 1-9.
- González-Barroso, M.M., A. Ledesma, S. Lepper, E. Pérez-Magán, P. Zaragoza, E. Rial. 2006. Isolation and bioenergetic characterization of mitochondria from *Pichia pastoris*. *Yeast*.**23**: 307-313.
- Goossens, A., N. de La Fuente, J. Forment, R. Serrano, F. Portillo. 2000. Regulation of yeast H (+)-ATPase by protein kinases belonging to a family dedicated to activation of plasma membrane transporters. *Mol. Cell. Biol.* **20**:7654–7661.
- Gustavsson, M., G. Barmark, J. Larsson, E. Murén, H. Ronne. 2008. Functional genomics of monensin sensitivity in yeast: implications for post-Golgi traffic and vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase function. *Mol Genet Genomics*.**280**: 233-248.
- Hames, B.D., S.J. Higgins.1985. In *Nucleic Acid Hybridization: A Practical Approach*. Pp 179-202, IRL Press, Oxford.
- Haro, R., M. A. Banuelos, M. E. Senn, J. Barrero-Gil, A. Rodríguez-Navarro. 2005. HKT1 mediates sodium uniport in roots: Pitfalls in the expression of HKT1 in yeast. *Plant Physiol.* **139**:1495–1506.

Haro, R., B. Garciadeblas, A. Rodríguez-Navarro. 1991. A novel P-type ATPase from yeast involved in sodium transport. *FEBS Lett.* **291**:189–191.

Haro, R., A. Rodríguez-Navarro. 2003. Functional analysis of the M2(D) helix of the TRK1 potassium transporter of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim. Biophys. Acta* **1613**:1-6.

Haro, R., A. Rodríguez-Navarro. 2002. Molecular analysis of the mechanism of potassium uptake through the TRK1 transporter of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim. Biophys. Acta* **1564**:114–122.

Haro, R., L. Sainz, F. Rubio, A. Rodríguez-Navarro. 1999. Cloning of two genes encoding potassium transporters in *Neurospora crassa* and expression of the corresponding cDNAs in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Microbiol.* **31**:511–520.

Hernández, A., X. Jiang, B. Cubero, P.M. Nieto, R.A. Bressan, P.M. Hasegawa, J.M. Pardo, 2009. Mutants of the *Arabidopsis thaliana* cation/H<sup>+</sup> antiporter AtNHX1 conferring increased salt tolerance in yeast: the endosome/prevacuolar compartment is a target for salt toxicity. *J. Biochem.* **284**: 14276-14285.

Herrero, A.B., D. Uccelletti, C.B. Hirschberg, A. Domínguez, C. Abeijón. 2002. The Golgi GDPase of the fungal pathogen *Candida albicans* affects morphogenesis, glycosylation, and cell wall properties. *Eukaryot. Cell.* **1**: 420-431.

Hirata, D., S. Harada, H. Namba, T. Miyakawa. 1995. Adaptation to high-salt stress in *Saccharomyces cerevisiae* is regulated by Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent phosphoprotein phosphatase (calcineurin) and cAMP-dependent protein kinase. *Mol. Gen. Genet.* **249**: 257–264.

Jiang, X., E.O. Leidi, J.M. Pardo. 2010. How do vacuolar NHX exchangers function in plant salt tolerance? *Plant Signal Behav.* **5**: 792-795

Kafadar, K. A., M. S. Cyert. 2004. Integration of stress responses: modulation of calcineurin signaling in *Saccharomyces cerevisiae* by protein kinase A. *Eukaryot. Cell* **3**:1147–1153.

Kahm, M., C. Navarrete, V. Llopis-Torregrosa, R. Herrera, L. Barreto, L. Yenush, J. Ariño, J. Ramos, M. Kschischo. 2012. Potassium starvation in yeast: mechanisms of homeostasis revealed by mathematical modeling. *PlosComput. Biol.* **8**: 1-11.

Ke, R., P.J. Ingram, K. Haynes. 2013. An integrative model of ion regulation in yeast, *PlosComput. Biol.* **9**:1-14.

Ketchum, K. A., W. J. Joiner, A. J. Sellers, L. K. Kaczmarek, S. A. Goldstein. 1995. A new family of outwardly rectifying potassium channel proteins with two pore domains in tandem. *Nature* **376**:690–695.

Kinclova, O., J. Ramos, S. Potier, H. Sychrová. 2001. Functional study of the *Saccharomyces cerevisiae* Nha1p C-terminus. *Mol. Microbiol.* **40**:656–668.

Kinclova-Zimmermannová, O., H. Flegelová, H. Sychrová. 2004. Rice Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>-antiporter Nhx1 partially complements the alkali-metal-cation sensitivity of yeast strains lacking three sodium transporters. *Folia Microbiol. (Praha)* **49**:519–525.

- Klionsky, D. J., P. K. Herman, S. D. Emr. 1990. The fungal vacuole: composition, function, and biogenesis. *Microbiol. Rev.* **54**:266–292.
- Ko, C. H., A. M. Buckley, R. F. Gaber. 1990. TRK2 is required for low affinity K<sup>+</sup> transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*.**125**:305–312.
- Ko, C. H., R. F. Gaber. 1991. TRK1 and TRK2 encode structurally related K<sup>+</sup> transporters in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **11**: 4266–4273.
- Kringstad, R., W.H. Kenyon, C.C.Black.1980.The rapid isolation of vacuoles from leaves of crassulacean Acid metabolism plants. *Plant Physiol.***66**: 379-382.
- Kuroda, T., H. Bihler, E. Bashi, C. L. Slayman, A. Rivetta. 2004. Chloride channel function in the yeast TRK-potassium transporters. *J. Membr. Biol.* **198**:177–192.
- Lang, B., G. Burger, I.Doxiadis, D.Y.Thomas, W.Bandlow, F. Kaudewitz. 1977. A simple method for the large-scale preparation of mitochondria from microorganisms. *Anal.Biochem.***77**: 110-121.
- Lapathitis, G., A. Kotyk. 1998. Univalent cation fluxes in yeast. *Biochem. Mol. Biol. Int.* **44**:371–380.
- Lecchi, S., C.J Nelson, K.E. Allen, D.L. Swaney, K.L.Thompson, J.J. Coon, M.R. Sussman, C.W. Slayman. 2007. Tandem Phosphorylation of Ser-911 and Thr-912 at the C Terminus of Yeast Plasma Membrane H<sup>+</sup>-ATPase Leads to Glucose-dependent Activation, *J. Biol. Chem.* **282**: 35471–35481.
- Lenassi, M., C. Gostincar, S. Jackman, M. Turk, I. Sadowski, C. Nislow, S. Jones, I. Birol, N. Gunde-Cimerman A. Plemenit s. 2013. Whole Genome Duplication Enrichment of Metal Cation Transporters Revealed by *De Novo* Genome Sequencing of Extremely Halotolerant Black Yeast *Hortaea werneckii*.*PLoS one* **8**:8.
- Loukin, S. H., B. Vaillant, X. L. Zhou, E. P. Spalding, C. Kung, Y. Saimi. 1997. Random mutagenesis reveals a region important for gating of the yeast K<sup>+</sup> channel Ykc1. *EMBO J.* **16**:4817–4825.
- Madrid, R., M. J. Gómez, J. Ramos, A. Rodríguez-Navarro. 1998. Ectopic potassium uptake in *trk1 trk2* mutants of *Saccharomyces cerevisiae* correlates with a highly hyperpolarized membrane potential. *J. Biol. Chem.* **273**:14838–14844.
- Maresová, L., H. Sychrová. 2005. Physiological characterization of *Saccharomyces cerevisiae* *kha1* deletion mutants. *Mol. Microbiol.* **55**:588– 600.
- Maresová, L., E. Urbankova, D. Gaskova, H. Sychrová. 2006. Measurements of plasma membrane potential changes in *Saccharomyces cerevisiae* cells reveal the importance of the Tok1 channel in membrane potential maintenance. *FEMS Yeast Res.* **6**:1039–1046.
- Márquez, J. A., R. Serrano. 1996. Multiple transduction pathways regulate the sodium-extrusion gene *PMR2/ENA1* during salt stress in yeast. *FEBS Lett.***382**:89–92.
- Martínez, R., M. T. Latreille, M. Mirande. 1991. A *PMR2* tandem repeat with a modified C-terminus is located downstream from the *KRS1* gene encoding lysyl-tRNA synthetase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Gen. Genet.* **227**:149–154.

- Martínez-Muñoz, G.A., A. Peña. 2005. In situ study of K<sup>+</sup> transport into the vacuole of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **22**: 689-704.
- Masuda, C. A., M. A. Xavier, K. A. Mattos, A. Galina, M. Montero-Lomeli. 2001. Phosphoglucomutase is an in vivo lithium target in yeast. *J. Biol. Chem.* **276**:37794–37801.
- Matheos, D. P., T. J. Kingsbury, U. S. Ahsan, K. W. Cunningham. 1997. Tcn1p/Crz1p, a calcineurin-dependent transcription factor that differentially regulates gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev.* **11**:3445–3458.
- Mendizabal, I., A. Pascual-Ahuir, R. Serrano, I. F. de Larrinoa. 2001. Promoter sequences regulated by the calcineurin-activated transcription factor Crz1 in the yeast ENA1 gene. *Mol. Genet. Genomics* **265**:801–811.
- Mendoza, I., F. Rubio, A. Rodríguez-Navarro, J. M. Pardo. 1994. The protein phosphatase calcineurin is essential for NaCl tolerance of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **269**:8792–8796.
- Michel, B., C. Lozano, M. Rodriguez, R. Coria, J. Ramírez, A. Pena. 2006. The yeast potassium transporter TRK2 is able to substitute for TRK1 in its biological function under low K and low pH conditions. *Yeast* **23**: 581–589.
- Miosga, T., A. Witzel, F. K. Zimmermann. 1994. Sequence and function analysis of a 9.46 kb fragment of *Saccharomyces cerevisiae* chromosome X. *Yeast* **10**:965–973.
- Mitchell, P. 1961. Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism. *Nature* **191**: 144-148.
- Mitsui, K., K. Hatakeyama, M. Matsushita, H. Kanazawa. 2009. *Saccharomyces cerevisiae* Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter Nha1p associates with lipid rafts and requires sphingolipid for stable localization to the plasma membrane. *J. Biochem.* **145**:709–720.
- Montiel, V., J. Ramos. 2007. Intracellular Na and K distribution in *Debaryomyces hansenii*. Cloning and expression in *Saccharomyces cerevisiae* of *DhNHX1*. *FEMS Yeast Res.* **7**: 102-109.
- Morsomme, P., C. W. Slayman, A. Goffeau. 2000. Mutagenic study of the structure, function and biogenesis of the yeast plasma membrane H(+)-ATPase. *Biochim. Biophys. Acta* **1469**:133–157.
- Mulet, J. M., M. P. Leube, S. J. Kron, G. Ríos, G. R. Fink, R. Serrano. 1999. A novel mechanism of ion homeostasis and salt tolerance in yeast: the Hal4 and Hal5 protein kinases modulate the Trk1-Trk2 potassium transporter. *Mol. Cell. Biol.* **19**:3328–3337.
- Mulet, J. M., V. Llopis-Torregrosa, C. Primo, M. Marqués, L. Yenush. 2013. Endocytic regulation of alkali metal transport proteins in mammals, Yeast and plants. *Curr.Genet.*(In press).
- Murguía, J. R., J. M. Belles, R. Serrano. 1996. The yeast HAL2 nucleotidase is an in vivo target of salt toxicity. *J. Biol. Chem.* **271**:29029–29033.



- Nakamura, T., Y. Liu, D. Hirata, H. Namba, S. Harada, T. Hirokawa, T. Miyakawa. 1993. Protein phosphatase type 2B (calcineurin)-mediated, FK506-sensitive regulation of intracellular ions in yeast is an important determinant for adaptation to high salt stress conditions. *EMBO J.* **12**: 4063–4071.
- Nass, R., R. Rao. 1998. Novel localization of a Na<sup>+</sup> / H<sup>+</sup> exchanger in a late endosomal compartment of yeast. Implications for vacuole biogenesis. *J. Biol. Chem.* **273**:21054–21060.
- Navarrete, C., S. Petrežsélyová, L.Barreto, J.L. Martínez, J. Zahrádka, J. Ariño, H. Sychrová, J. Ramos. 2010. Lack of main K<sup>+</sup> uptake systems in *Saccharomyces cerevisiae* cells affects yeast performance in both potassium-sufficient and potassium-limiting conditions. *FEMS Yeast Res.***10**: 508-517.
- Nelissen, B., W. R. De, A. Goffeau. 1997. Classification of all putative permeases and other membrane plurispanners of the major facilitator superfamily encoded by the complete genome of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol.Rev.* **21**:113–134.
- Nowikovsky, K., E. M. Froschauer, G. Zsurka, J. Samaj, S. Reipert, M. Kolisek, G. Wiesenberger, R. J. Schweyen. 2004. The LETM1/YOL027 gene family encodes a factor of the mitochondrial K<sup>+</sup> homeostasis with a potential role in the Wolf-Hirschhorn syndrome. *J. Biol. Chem.* **279**:30307–30315.
- Nowikovsky, K., S. Reipert, R. J. Devenish, R. J. Schweyen. 2007. Mdm38 protein depletion causes loss of mitochondrial K<sup>+</sup> / H<sup>+</sup> exchange activity, osmotic swelling and mitophagy. *Cell Death Differ.* **14**:1647–1656.
- O'Donnell, A., L. Huang, J. Thorner, M. Cyert. 2013. A Calcineurin-dependent switch Controls the Trafficking Function of  $\alpha$ -Arrestin Aly1/Art6. *J. Biol. Chem.***288**: 24063-24080.
- Ohsumi, Y., Y. Anraku. 1981.Active transport of basic amino acids driven by a proton motive force in vacuolar membrane vesicles of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.***256**: 2079-2082.
- Okorokov, L.A., L.P. Lichko, I.S. Kulaev. 1980. Vacuoles: main compartments of potassium, magnesium, and phosphate ions in *Saccharomyces carlsbergensis* cells. *J. Bacteriol.* **144**: 661-665.
- Onken, H., M. Putzenlechner.1995. A V-ATPase drives active, electrogenic and Na<sup>+</sup>-independent Cl<sup>-</sup> absorption across the gills of *Eriocheir sinensis*.*J. Exp. Biol.***198**: 767-774
- Ortega, M. D., A. Rodríguez-Navarro. 1985. Potassium and rubidium effluxes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Z. Naturforsch.* **40c**:721–725.
- Page, M.J., E. Di Cera.2006. Role of Na<sup>+</sup> and K<sup>+</sup> in enzyme function. *Physiol Rev.***86**: 1049-1092.
- Perkins, J., G.M. Gadd. 1993. Accumulation and intracellular compartmentation of lithium ions in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol.Lett.***107**: 255-260.

Persson, B. L., A. Berhe, U. Fristedt, P. Martínez, J. Pattison, J. Petersson, R. Weinander. 1998. Phosphate permeases of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim. Biophys. Acta* **1365**:23–30.

Petrezsélyová, S., J. Ramos, H. Sychrová. 2011. Trk2 transporter is a relevant player in K<sup>+</sup> supply and plasma-membrane potential control in *Saccharomyces cerevisiae*. *Folia Microbiol (Praha)* **56**: 23-28.

Petrezsélyová, S., O. Kinclova-Zimmermannova, H. Sychrová. 2013. Vhc1, a novel transporter belonging to the family Electroneutral cation-Cl<sup>-</sup> cotransporters, participates in the regulation of cation content and morphology of *Saccharomyces cerevisiae* vacuoles. *Biochim. Biophys. Acta* **1828**: 623-631.

Platara, M., A. Ruíz, R. Serrano, A. Palomino, F. Moreno, J. Ariño. 2006. The transcriptional response of the yeast Na<sup>+</sup>-ATPase ENA1 gene to alkaline stress involves three main signaling pathways. *J. Biol. Chem.* **281**: 36632–36642.

Portillo, F. 2000. Regulation of plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase in fungi and plants. *Biochim. Biophys. Acta* **1469**:31–42.

Portillo, F., P. Eraso, R. Serrano. 1991. Analysis of the regulatory domain of yeast plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase by directed mutagenesis and intragenic suppression. *FEBS Lett.***287**:71–74.

Posas, F., M. Camps, J. Ariño. 1995. The PPZ protein phosphatases are important determinants of salt tolerance in yeast cells. *J. Biol. Chem.* **270**:13036–13041.

Prescott, S., y R. Breed. 1910. The determination of the number of body cells in milk by a direct method. *J. Infect. Dis.* **7**: 632.

Price, A., D. Seals, W. Wickner, C. Ungermann C. 2000. The docking stage of yeast vacuole fusion requires the transfer of proteins from a cis-SNARE complex to a Rab/Ypt protein. *J. Cell Biol.***148**: 1231-1238.

Pribylova, L., K. Papouskova, M. Zavrel, J. L. Souciet, H. Sychrová. 2006. Exploration of yeast alkali metal cation/H<sup>+</sup> antiporters: sequence and structure comparison. *Folia Microbiol. (Praha)* **51**:413–424.

Proft, M., K. Struhl. 2004. MAP kinase-mediated stress relief that precedes and regulates the timing of transcriptional induction. *Cell* **118**: 351–361.

Qiu, Q.S., R.A. Fratti. 2010. The Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger Nhx1p regulates the initiation of *Saccharomyces cerevisiae* vacuole fusion. *J. Cell. Sci.* **123**: 3266-3275

Ramos, J., R. Alijo, R. Haro, A. Rodríguez-Navarro. 1994. TRK2 is not a low-affinity potassium transporter in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* **176**:249–252.

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

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

- Ramos, J., A. Rodríguez-Navarro. 1986. Regulation and interconversion of the potassium transport system of *Saccharomyces cerevisiae* as revealed by rubidium transport. Eur. J. Biochem. **154**:307-311.
- Rao, R., D. Drummond-Barbosa, C. W. Slayman. 1993. Transcriptional regulation by glucose of the yeast PMA1 gene encoding the plasma membrane H(+)-ATPase. Yeast **9**:1075-1084.
- Reid, J. D., W. Lukas, R. Shafaatian, A. Bertl, C. Scheurmann-Kettner, H. R. Guy, R. A. North. 1996. The *S. cerevisiae* outwardly-rectifying potassium channel (DUK1) identifies a new family of channels with duplicated pore domains. Receptors Channels **4**:51-62.
- Rivetta, A., K.E. Allen, C.W. Slayman, C.L. Slayman. 2013. Coordination of K<sup>+</sup> transporters in *neurospora*: TRK1 is scarce and constitutive, while HAK1 is abundant and highly regulated. Eukaryot.Cell. **12**: 684-696.
- Rivetta, A., C. Slayman, T. Kuroda. 2005. Quantitative modeling of chloride conductance in yeast TRK potassium transporters. Biophysical Journal.**89**: 2412-2426.
- Rodríguez-Navarro, A. 2000.Potassium transport in fungi and plants.Biochim.Biophys. Acta **1469**:1-30.
- Rodríguez-Navarro, A., J. Ramos. 1984. Dual system for potassium transport in *Saccharomyces cerevisiae*. J. Bacteriol. **159**:940-945.
- Roomans, G. M., F. Blasco, G. W. Borst-Pauwels. 1977. Cotransport of phosphate and sodium by yeast. Biochim.Biophys. Acta **467**:65-71.
- Roomans, G.M., L.A. Sevéus. 1976. Subcellular localization of diffusible ions in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: quantitative microprobe analysis of thin freeze-dried sections. J. Cell Sci.**21**: 119-127.
- Rott, R., N. Nelson. 1981. Purification and immunological properties of proton-ATPase complexes from yeast and liver mitochondria. . J. Biol. Chem. **256**: 9224-9292.
- Rubio, F., W. Gassmann, y J. I. Schroeder. 1995. Sodium-driven potassium uptake by the plant potassium transporter HKT1 and mutations conferring salt tolerance. Science **270**:1660-1663.
- Rudolph, H. K., A. Antebi, G. R. Fink, C. M. Buckley, T. E. Dorman, J. LeVitre, L. S. Davidow, J. I. Mao, D. T. Moir. 1989. The yeast secretory pathway is perturbed by mutations in PMR1, a member of a Ca<sup>2+</sup> ATPase family. Cell **58**:133-145.
- Ruíz, A., L. Yenush, J. Ariño. 2003. Regulation of ENA1 Na (+)-ATPase gene expression by the Ppz1 protein phosphatase is mediated by the calcineurin pathway. Eukaryot. Cell **2**:937-948.
- Ruíz, A., J. Ariño. 2007. Function and regulation of the *Saccharomyces cerevisiae* ENA sodium ATPase system. Eukaryot. Cell **6**:2175-2183.
- Schenkman, J.B., E.L. Cinti. 1978. Preparation of microsomes with calcium. Methods in Enzymol.**52**, 83-89.

- Sengottaiyan P., L. Ruíz-Pavón, B. Persson. 2012. Functional expression, purification and reconstitution of the recombinant phosphate transporter Pho89 of *Saccharomyces cerevisiae*. FEBS Journal. **280**: 965-975.
- Serrano, R. 1983. In vivo glucose activation of the yeast plasma membrane ATPase. FEBS Lett. **156**:11-14.
- Serrano, R., A. Ruíz, D. Bernal, J. R. Chambers, J. Ariño. 2002. The transcriptional response to alkaline pH in *Saccharomyces cerevisiae*: evidence for calcium-mediated signalling. Mol. Microbiol. **46**:1319-1333.
- Sherman, F. 1991. Guide of yeast genetics and molecular biology. Methods Enzymol. **194**: 3-21.
- Stefan, C., N. Zhang, T. Sokabe, A. Rivetta, C. Slayman, C., Montell, K. Cunningham. 2013. Activation of an essential calcium signaling pathway in *Saccharomyces cerevisiae* by Kch1 and Kch2, putative low-affinity potassium transporters. Eukaryot. Cell **12**:204-214.
- Strick, R., P.L. Strissel, K. Gavrilov, R. Levi-Setti. 2001. Cation-chromatin binding as shown by ion microscopy is essential for the structural integrity of chromosomes. J Cell Biol. **155**: 899-910.
- Thevelein J.M., K. Voordeckers. 2009. Functioning and evolutionary significance of nutrients transceptors, Mol. Biol. Evol. **26**: 2407-2414.
- Trounce, I.A., Y.L. Kim, A.S. Jun, D.C. Wallace. 1996. Assessment of mitochondrial oxidative phosphorylation in patient muscle biopsies, lymphoblasts, and transmittochondrial cell lines. Methods Enzymol. **264**: 484-509.
- Tuteja, N. 2007. Mechanisms of high salinity tolerance in plants. Methods Enzymol. **428**: 419-438.
- Venema, K., A. Belver, M.C. Marín-Manzano, M.P. Rodríguez-Rosales, J.P. Donaire. 2003. A novel intracellular K<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter related to Na<sup>+</sup> / H<sup>+</sup> antiporters is important for K<sup>+</sup> ion homeostasis in plants. J. Biol. Chem. **278**: 22453-22459
- Vergani, P., T. Miosga, S. M. Jarvis, M. R. Blatt. 1997. Extracellular K<sup>+</sup> and Ba<sup>2+</sup> mediate voltage-dependent inactivation of the outwardrectifying K<sup>+</sup> channel encoded by the yeast gene TOK1. FEBS Lett. **405**: 337-344.
- Vidal, M., A. M. Buckley, C. Yohn, D. J. Hoepfner, R. F. Gaber. 1995. Identification of essential nucleotides in an upstream repressing sequence of *Saccharomyces cerevisiae* by selection for increased expression of TRK2. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. **92**:2370-2374.
- Viladevall, L., R. Serrano, A. Ruíz, G. Domenech, J. Giraldo, A. Barceló, J. Arino. 2004. Characterization of the calcium-mediated response to alkaline stress in *Saccharomyces cerevisiae*. J. Biol. Chem. **279**:43614-43624.
- Warringer, J., E. Ericson, L. Fernández, O. Nerman, A. Blomberg. 2003. High-resolution yeast phenomics resolves different physiological features in the saline response. Proc Natl Acad. Sci. USA. **100**: 15724-15729.

- Wiebe, C. A., C. Rieder, P. G. Young, P. Dibrov, L. Fliegel. 2003. Functional analysis of amino acids of the Na<sup>+</sup> / H<sup>+</sup> exchanger that are important for proton translocation. *Mol. Cell. Biochem.* **254**:117–124.
- Wieland, J., A. M. Nitsche, J. Strayle, H. Steiner, H. K. Rudolph. 1995. The PMR2 gene cluster encodes functionally distinct isoforms of a putative Na<sup>+</sup> pump in the yeast plasma membrane. *EMBO J.* **14**:3870–3882.
- Yanagisawa, K., D. Resnick, C. Abeijon, P. Robbins, C. Hirschberg. 1990. A guanosine diphosphatase enriched in Golgi vesicles of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **265**: 19351-19355.
- Yenush, L., S. Merchan, J. Holmes, R. Serrano. 2005. pH-responsive, posttranslational regulation of the Trk1 potassium transporter by the type 1-related Ppz1 phosphatase. *Mol. Cell. Biol.* **25**:8683–8692.
- Yenush, L., J. M. Mulet, J. Ariño, R. Serrano. 2002. The Ppz protein phosphatases are key regulators of K<sup>+</sup> and pH homeostasis: implications for salt tolerance, cell wall integrity and cell cycle progression. *EMBO J.* **21**:920–929.
- Yi, T.M., Y. Huang, M.I. Simon, J. Doyle. 2000. Robust perfect adaptation in bacterial chemotaxis through integral feedback control, *Proc Natl Acad Sci.* **97**: 4649-4653.
- Yonetani, T. 1965. Studies on cytochrome c peroxidase. II. Stoichiometry between enzyme, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, and ferrocytochrome c and enzymic determination of extinction coefficients of cytochrome C. *J. Biol. Chem.* **240**: 4509-4514
- Yoshimoto, H., K. Saltsman, A. P. Gasch, H. X. Li, N. Ogawa, D. Botstein, P. O. Brown, M. S. Cyert. 2002. Genome-wide analysis of gene expression regulated by the calcineurin/Crz1p signaling pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **277**:31079–31088.
- Zahrádka, J., H. Sychrová. 2012. Plasma-membrane hyperpolarization diminishes the cation efflux via Nha1 antiporter and Ena ATPase under potassium-limiting conditions. *FEMS Yeast Res.* **12**:439-446.
- Zhang, Z., J. Reese. 2006. Isolation of yeast nuclei and micrococcal nuclease mapping of nucleosome positioning. In *Yeast Protocols* (Xiao, W., ed.), pp 245-255, Humana Press, New Jersey.
- Zhao, J., W. Lin, X. Ma, Q. Lu, X. Ma, G. Bian, L. Jiang. 2010. The protein kinase Hal5p is the high-copy suppressor of lithium-sensitive mutations of genes involved in the sporulation and meiosis as well as the ergosterol biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genomics* **95**: 290-298.
- Zhou, X. L., B. Vaillant, S. H. Loukin, C. Kung, Y. Saimi. 1995. YKC1 encodes the depolarization-activated K<sup>+</sup> channel in the plasma membrane of yeast. *FEBS Lett.* **373**:170–176.
- Zörgö, E., K. Chwialkowska, A. Gjuvslund, E. Garré, P. Sunnerhagen, G. Liti, A. Blomberg, S. Omholt, J. Warringer. 2013. Ancient evolutionary Trade-Offs between Yeast Ploidy States. *PLoS Genet.* **9**:3.

Zotova, L., M. Aleschko, G. Sponder, R. Baumgartner, S. Reipert, M. Prinz M., R.J. K. Nowikovsky. 2010. Novel components of an active mitochondrial K (+)/H (+) exchange. *J. Biol. Chem.***285**: 14399-14414.

Zuily-Fodil, Y., C. Passaquet, C. R. Esnault. 1978. High yield isolation of nuclei from plant protoplasts. *Physiologia Plantarum.***43**: 201-204



## ANEXOS





Fruto de la realización de este trabajo de tesis se han publicado en las revistas Biochemical Journal y Biochimica Biophysica Acta que aparecen a continuación y en el contexto de los trabajos del grupo de investigación hemos participado en otros dos trabajos: Kahm *et al.*, 2013 PLOS Computational Biology y Barreto *et al.*, 2011 Eukaryotic Cell.



# Subcellular potassium and sodium distribution in *Saccharomyces cerevisiae* wild-type and vacuolar mutants

Rito HERRERA\*, María C. ÁLVAREZ\*, Samuel GELIS\* and José RAMOS\*<sup>1</sup>

\*Departamento de Microbiología, Edificio Severo Ochoa, Campus de Rabanales, Universidad de Córdoba, Apdo. 3048, E-14080 Córdoba, Spain

Living cells accumulate potassium (K<sup>+</sup>) to fulfil multiple functions. It is well documented that the model yeast *Saccharomyces cerevisiae* grows at very different concentrations of external alkali cations and keeps high and low intracellular concentrations of K<sup>+</sup> and sodium (Na<sup>+</sup>) respectively. However less attention has been paid to the study of the intracellular distribution of these cations. The most widely used experimental approach, plasma membrane permeabilization, produces incomplete results, since it usually considers only cytoplasm and vacuoles as compartments where the cations are present in significant amounts. By isolating and analysing the main yeast organelles, we have determined the subcellular location of K<sup>+</sup> and Na<sup>+</sup> in *S. cerevisiae*. We show that while vacuoles accumulate most of the intracellular K<sup>+</sup> and Na<sup>+</sup>,

the cytosol contains relatively low amounts, which is especially relevant in the case of Na<sup>+</sup>. However K<sup>+</sup> concentrations in the cytosol are kept rather constant during the K<sup>+</sup>-starvation process and we conclude that, for that purpose, vacuolar K<sup>+</sup> has to be rapidly mobilized. We also show that this intracellular distribution is altered in four different mutants with impaired vacuolar physiology. Finally, we show that both in wild-type and vacuolar mutants, nuclei contain and keep a relatively constant and important percentage of total intracellular K<sup>+</sup> and Na<sup>+</sup>, which most probably is involved in the neutralization of negative charges.

Key words: alkali cation, intracellular location, potassium (K<sup>+</sup>), sodium (Na<sup>+</sup>), yeast.

## INTRODUCTION

Potassium (K<sup>+</sup>) is a fundamental element for living cells. It is usually scarce in the majority of ecosystems and it is well known that it is required to fulfil multiple cellular functions, such as regulation of intracellular pH, compensation of negative charges in many macromolecules, or maintenance of cell volume, turgor or plasma membrane electrochemical potential [1–3]. In contrast, sodium (Na<sup>+</sup>) is the most abundant cation in natural environments, but its accumulation is toxic for most organisms. It has been reported by several groups that the model yeast *Saccharomyces cerevisiae* is able to grow in a broad range of external [K<sup>+</sup>], that the intracellular concentration usually ranges from 200 to 300 mM under normal growth conditions and that it decreases at limiting K<sup>+</sup> or in the presence of high Na<sup>+</sup> [2,3]. Therefore *S. cerevisiae* cells tend to accumulate K<sup>+</sup> against high concentration gradients, and the main plasma membrane potassium transporter Trk1 plays a crucial role in the process [2,3]. Two recent genome-wide studies identified multiple genes from different functional categories involved in K<sup>+</sup> homeostasis highlighting the complexity of the process [4,5]. In addition, little attention has been paid to the detailed analysis of K<sup>+</sup> and Na<sup>+</sup> intracellular distribution in yeast. The subcellular localization of cations under different external conditions has not been definitively clarified, despite the fact that subcellular compartmentalization is critical for eukaryotic cellular physiology and, for example, it is generally accepted that vacuolar Na<sup>+</sup> sequestration plays an important role in both in yeast and plant cells [6,7]. The existence of K<sup>+</sup>/Na<sup>+</sup> transporters in organelles such as vacuoles and endosome/prevacuolar compartments [8–10] or mitochondria [11] reinforces the possible physiological importance of cation compartmentalization.

By using energy-dispersive X-ray microanalysis, it was reported more than three decades ago that the intracellular

distributions of K<sup>+</sup>, rubidium (Rb<sup>+</sup>) and caesium (Cs<sup>+</sup>) were very similar, and that the concentrations of these ions in the cytoplasm were approximately equal to those in the nucleus and twice those found in the vacuole [12]. However, possibly due to the fact that the technique was not readily available for many groups or maybe because those experiments were performed under non-physiological conditions (prior to analysis, yeast cells were suspended in water for 1 day), the fact is that this work did not have the impact and significance that it may have had. The only relatively widely used approach to investigate the question of subcellular cation localization in yeast is the use of substances such as cytochrome *c* [13–15], DEAE dextran [16] or digitonin [17] to permeabilize the plasma membrane. This is a convenient and rapid method, but the main limitation of the procedure is that the results are too simplistic, since it usually considers only two important compartments where the cations are present in significant amounts; K<sup>+</sup> extracted after permeabilization is considered the cytoplasmic fraction, whereas the remaining amount is ascribed to the vacuole. After using these procedures, most of the investigations conclude that cations accumulate in the vacuolar fraction to significantly higher amounts than in the cytoplasmic fraction [13,15,16], which is in contradiction with what was previously published by Roomans and Sevéus [12].

On the basis of the isolation of the main yeast organelles, we have optimized a procedure to determine the subcellular location of K<sup>+</sup> and Na<sup>+</sup> in *S. cerevisiae* wild-type cells harvested under several conditions. Moreover, we have applied the same procedure to four different vacuolar mutants. We conclude that while vacuoles accumulate most intracellular K<sup>+</sup> and Na<sup>+</sup>, the cytosol contains relatively low amounts of these cations. However, the concentrations of K<sup>+</sup> in the cytosol are kept rather constant during the K<sup>+</sup>-starvation process and for that purpose vacuolar K<sup>+</sup> has to be rapidly mobilized. We also found that this intracellular distribution is altered in four different mutants with impaired

Abbreviations used: ER, endoplasmic reticulum; V-ATPase, vacuolar ATPase.

<sup>1</sup> To whom correspondence should be addressed (email mi1raruj@uco.es).

**Table 1** Strains used in the present study

Strain	Genotype	Gene function
BY4741	<i>MATa his3Δ1 leuΔ0 met15Δ0 ura3Δ0</i>	
$\Delta ptc1$	<i>ptc1::NAT1</i>	PP2C type protein phosphatase
$\Delta vam6$	<i>vam6::kan MX4</i>	Vacuolar morphogenesis protein
$\Delta vnx1$	<i>vnx1::LEU2</i>	Vacuolar Na <sup>+</sup> (K <sup>+</sup> )/H <sup>+</sup> exchanger
$\Delta nhx1$	<i>nhx1::LEU2</i>	Prevacuolar–vacuolar Na <sup>+</sup> (K <sup>+</sup> )/H <sup>+</sup> exchanger

vacuolar physiology. Finally, we show that in all strains we have studied, the nuclei have and maintain a relatively constant and important percentage of the total intracellular K<sup>+</sup> and Na<sup>+</sup>.

## EXPERIMENTAL

### Yeast strains and culture conditions

The *S. cerevisiae* wild-type and isogenic mutant strains used in the present study and their genotypes are listed in Table 1. Yeast cells were cultured with shaking at 28 °C. ‘Normal K<sup>+</sup> cells’ were grown in YPD medium [1% (w/v) yeast extract and 2% (w/v) glucose], ‘Na<sup>+</sup>-grown cells’ were grown in YPD supplemented with 0.8 M NaCl, and ‘K<sup>+</sup>-starved cells’ were obtained by growing cells in synthetic K<sup>+</sup>-free medium [YNB-F (0.17% yeast nitrogen base without amino acids, ammonium sulfate and K<sup>+</sup> (pH 5.8), Formedium™) supplemented with 50 mM KCl and incubating them for an additional 4 h in the same medium lacking added K<sup>+</sup> [18]. Cells were generally harvested during the exponential growth phase at  $D_{600}$  values close to 1.0. In the case of *nhx1* mutant grown in Na<sup>+</sup>, cells were collected at  $D_{600}$  values of 0.2–0.3.

### Growth curves

To estimate the growth of the different strains, liquid YPD, supplemented or not with 0.8 M NaCl, was inoculated with yeast cells ( $D_{600} = 0.05$ ) and growth was monitored for 25 h.

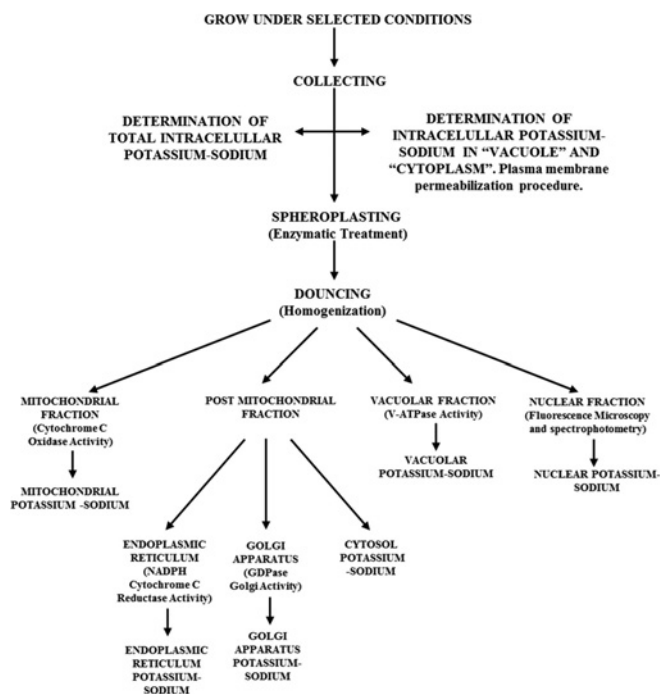
### Isolation of main organelles from yeast

All centrifugation steps were carried out at 4 °C in plastic tubes and all buffers were kept on ice. Protocols were adapted in order to use K<sup>+</sup>- and Na<sup>+</sup>-free buffers. Figure 1 shows the general workflow followed in these experiments.

### Isolation of vacuoles

Vacuoles were isolated as described previously [19,20] with minor modifications. Briefly, cells were grown, washed and treated with lyticase-100KU (2 mg/g of cells for 55 min). The spheroplasts were resuspended in 10 mM Tris/Mes (pH 6.9), 0.1 mM MgCl<sub>2</sub> and 12% Ficoll, homogenized using a Dounce homogenizer and centrifuged at 26 600 g for 60 min. The white layer at the top of the tubes, which contained most of the vacuoles, was collected and resuspended in the same buffer.

The vacuole protein concentration was determined using the Bradford protein assay [21]. For measuring V-ATPase (vacuolar ATPase) activity, we followed the procedure described by Cagnac et al. [9] with minor modifications. Vacuole protein (25 μg) was added to a buffer containing 50 mM tetramethyl ammonium chloride, 5 μM Acridine Orange, 5 mM Tris/Mes



**Figure 1** Steps in the workflow for the determination of intracellular cation distribution

Time taken for the preparation was less than 4 h.

(pH 7.5), 3.125 mM MgSO<sub>4</sub>, 1 mM sodium azide (to inhibit F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATPase) and 1 mM sodium vanadate (to inhibit P-type ATPases) [22]. The V-ATPase activity was activated by the addition of 5 mM Tris-ATP, and time-dependent fluorescence changes were monitored using a fluorometer (SPECTRAFluor Plus, Tecan), with excitation and emission wavelengths at 485 and 535 nm respectively. The vacuolar activity was inhibited with the addition of 1 μM bafilomycin A. The V-ATPase activity was defined as the difference between the activities obtained with and without 1 μM bafilomycin A in the total homogenate and in the vacuole fraction.

### Isolation of nuclei

The isolation of nuclei from yeasts was performed following the procedure described by Zhang and Reese [23]. Basically, the cells were grown, washed and treated with lyticase-100KU. The spheroplasts obtained were resuspended in sorbitol digestion buffer [1.4 M sorbitol, 40 mM HEPES-(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (pH 7.5) and 0.5 mM MgCl<sub>2</sub>], supplemented with 1 mM PMSF and 2 mM 2-mercaptoethanol, homogenized using a Dounce homogenizer and centrifuged at 21 500 g for 30 min. The pellet was resuspended in digestion buffer.

To estimate the proportion of nuclei recovered, 100 μl of the nuclei suspension was diluted in 900 μl of digestion buffer and  $D_{600}$  was measured. The reading should be approximately 0.2 for 1 g of cells [23]. In addition, the number of nuclei was determined in spheroplasts and the nuclear fraction using minor modifications of the Prescott–Breed method [24]. Basically, the spheroplasts and the nuclei fraction was thinly smeared on microscope slides and equilibrated with PBS. DAPI staining solution was added and the slides were incubated for 5 min at room temperature (25 °C). Background fluorescence was eliminated adding antifade reagent (Slowfade® Gold antifade reagent, Life Technologies). Samples were observed and nuclei counted using a fluorescence

microscope with a Mercury-arc lamp (the excitation maximum of DAPI bound to dsDNA is 358 nm and the emission maximum is 461 nm).

### Isolation of mitochondria

Isolation of mitochondria was performed following the procedure described by Zotova et al. [25] with some modifications. After lyticase-100KU treatment, the spheroplasts were centrifuged, washed and resuspended in 2.4 M sorbitol and 0.2 M  $\text{NH}_4\text{PO}_3$  (pH 7.4). The spheroplasts were homogenized in a Dounce homogenizer. Mitochondria were recovered by centrifugation at 11 000 *g* and the pellet was resuspended in the same buffer.

Mitochondrial protein concentration was determined by the Bradford protein assay [21]. Cytochrome *c* oxidase activity was measured as described previously [26,27]. The oxidation of cytochrome *c* by cytochrome *c* oxidase was followed spectrophotometrically at 550 nm for 30 s, assuming  $\epsilon 1 \text{ cm} = 19600$  per mol for horse heart cytochrome *c* [28]. The mitochondrial fraction cytochrome *c* oxidase activity was expressed as a percentage of the total homogenate activity.

### Isolation of ER (endoplasmic reticulum)

ER was obtained by using the Endoplasmic Reticulum Isolation kit (Sigma) with some minor modifications. Spheroplasts were prepared and homogenized as described above [19,20]. The homogenate was centrifuged at 1000 *g* for 10 min. Then, the corresponding supernatant was centrifuged at 15 000 *g* for 15 min. The resulting supernatant was the so-called post-mitochondrial fraction. This fraction was then precipitated with 7 volumes of 8 mM  $\text{CaCl}_2$  and centrifuged at 8000 *g* for 10 min. The ER partitioned to the insoluble fraction, which was resuspended in 10 mM Tris/Mes (pH 6.9), 0.1 mM  $\text{MgCl}_2$  and 12 % Ficoll buffer.

The ER protein concentration was determined using the Bradford protein assay [21]. The ER NADPH-cytochrome *c* activity was determined using the Cytochrome *c* Reductase (NADPH) Assay kit (Sigma) and was expressed as a percentage of the total homogenate activity.

### Isolation of the Golgi apparatus

The Golgi apparatus was isolated as described previously [29] with some minor modifications. Spheroplasts were homogenized and centrifuged, and the post-mitochondrial fraction was obtained as described for ER. A 1 ml aliquot of that fraction was placed on the top of a gradient containing 1 ml steps of 22, 26, 30, 34, 38, 42, 46, 50 and 54 % (w/w) sucrose in 10 mM Hepes (pH 7.5) and 1 mM  $\text{MgCl}_2$ . Gradients were centrifuged at 30 000 rev./min for 150 min in a Beckman SW41 rotor. Fractions of 660  $\mu\text{l}$  (12-drop) were collected from the top to the bottom. The sucrose density was measured with a refractometer (Atago). Protease inhibitors were added to the fractions.

Step 26 was enriched with Golgi apparatus protein. The Golgi GDPase activity was measured in vesicle fractions of the different steps in buffer containing 0.2 M imidazole (pH 7.5), 10 mM  $\text{CaCl}_2$ , 0.1 % Triton X-100 and 2 mM GDP; 100  $\mu\text{l}$  of this solution, containing 20  $\mu\text{g}$  of sample protein, was incubated at 30°C for 30 min. The reaction was stopped by transferring the tubes to ice and adding 10  $\mu\text{l}$  of 10 % SDS. To determine the amount of phosphate released during hydrolysis, 200  $\mu\text{l}$  of ultra-pure water and 700  $\mu\text{l}$  of Ames reagent (1:6 mixture of 10 % ascorbic acid and 0.42 % ammonium molybdate in 0.5 M sulfuric acid) were added to each tube; following incubation at 45°C for 20 min, absorbance was measured at 660 nm [30]. The Golgi

apparatus fraction GDPase activity was expressed as a percentage of the total homogenate activity.

### Cytosolic fraction

In order to obtain the cytosol, spheroplasts were homogenized and centrifuged, and the post-mitochondrial fraction was isolated as described for the ER. That fraction was centrifuged at 35 000 rev./min for 60 min and then the supernatant was again centrifuged at 45 000 rev./min for 150 min (in a Beckman 50.2 TI rotor). The resulting supernatant corresponded to the soluble fraction of the cytoplasm [31].

### Cross-contamination activity

The vacuolar cross-contamination in the nuclei, and mitochondrial and ER fractions was determined fluorimetrically by measuring the V-ATPase activity [19,20]. The nuclei cross-contamination was estimated by using a fluorescence microscope to observe nuclei [24,32] and spectrophotometrically to determine the presence of nucleic acids [23] in the vacuolar, ER and mitochondrial fractions. The degree of mitochondrial cross-contamination in the vacuolar, ER and nuclear fractions was determined spectrophotometrically measuring cytochrome *c* oxidase activity [26,27]. The Golgi apparatus cross-contamination was determined spectrophotometrically measuring Golgi GDPase activity in vacuolar, mitochondrial, nuclei and ER fractions.

### Plasma membrane permeabilization procedure

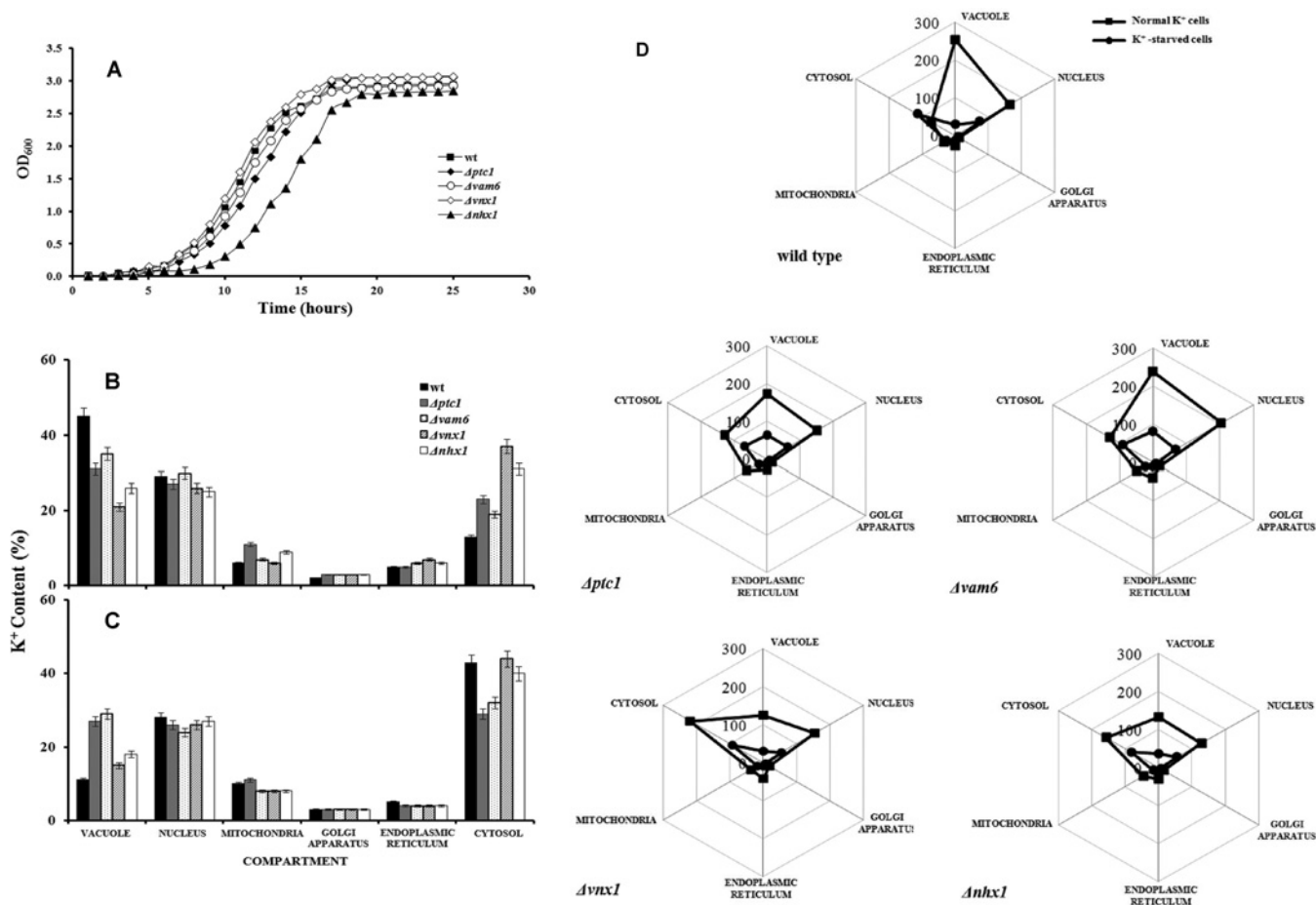
In order to permeabilize yeast plasma membranes, the procedure described by Okorokov et al. [13] was slightly modified. Cells were washed with 0.9 M mannitol, 1 mM Hepes, 5 mM  $\text{MgSO}_4$  and 10 mM  $\text{CaCl}_2$ . To make the plasmalemma readily permeable to cations, the cells were treated for 15 min with 2 % cytochrome *c* solution (0.9 M mannitol, 2 % cytochrome *c*, 18  $\mu\text{g}/\text{ml}$  antimycin, 1 mM Hepes, 5 mM  $\text{MgSO}_4$ , 10 mM  $\text{CaCl}_2$  and 5 mM 2-deoxy-D-glucose). Permeabilized cells were recovered by centrifugation and the supernatant was kept (the 'cytoplasmic fraction'). Then vacuoles in the pellet were lysed by osmotic shock by adding 5 ml of water (the 'vacuolar fraction').

### $\text{K}^+$ and $\text{Na}^+$ measurements

To estimate internal  $\text{K}^+$  and  $\text{Na}^+$  content, cell samples were collected on Millipore filters, which were rapidly washed with 20 mM  $\text{MgCl}_2$ . Whole cells [33] and subcellular fractions were then extracted with acid and  $\text{K}^+$  and  $\text{Na}^+$  were analysed by atomic emission spectrophotometry. Cation content in the different organelles was calculated taking into consideration the percentage of nuclei, vacuoles, mitochondria, Golgi apparatus and ER isolated. In all cases values are expressed as nmol of  $\text{K}^+/\text{Na}^+$  per mg of dry weight cells.

### Statistical analyses of the results

In all cases three to four independent experiments were used for every condition. Values shown are means  $\pm$  S.E.M. In some experiments, the significance of differences between mean values was determined by ANOVA using Tukey's test. A *P* value  $< 0.05$  was considered significant. Statistical processing was carried out using SPSS software.



**Figure 2** Subcellular K<sup>+</sup> localization in wild-type and vacuolar mutants

(A) Growth curves of normal K<sup>+</sup> cells. Yeast cells were inoculated in YPD medium at  $D_{600} = 0.01$  and a representative curve is shown. (B and C) Percentage relative to total intracellular K<sup>+</sup> located in vacuole, nucleus, mitochondria, Golgi apparatus, ER and cytosol in normal K<sup>+</sup> cells (B) and K<sup>+</sup>-starved cells (C). Data are means  $\pm$  S.E.M. for four independent experiments. (D) Radar graphs of quantitative K<sup>+</sup> changes (nmol/mg) after starvation in wild-type and vacuolar mutants.

## RESULTS

### Efficiency of the isolation procedure

Yeast cells obtained under several conditions were treated as described in the Experimental section in order to determine the intracellular cation distribution, efficiency of the isolation procedures and cross contaminations. As a first step, we checked that intracellular K<sup>+</sup> was not lost during the spheroplasting procedure both in wild-type and vacuolar mutants (less than 5% of total K<sup>+</sup> was lost in all cases). After the different organelle isolation steps, 91% ( $\pm 8\%$ ), 40% ( $\pm 8\%$ ), 27% ( $\pm 3\%$ ), 71% ( $\pm 6\%$ ) and 87% ( $\pm 3\%$ ) of the nuclei, vacuoles, mitochondria, ER and Golgi apparatus were isolated and used to determine their cation content. Those percentages are comparable with what has been previously described in the literature when these organelles are isolated for different purposes [34–41]. Moreover our control tests to determine possible cross-contaminations showed that the mitochondria, vacuoles, Golgi apparatus or ER contaminating other fractions were usually below 5%. Owing to the isolation procedure, the Golgi apparatus fraction is practically free of other organelles [29]. Vacuolar, ER and mitochondrial fractions were virtually free from nuclei contamination since on the one hand, no nuclei were detected by microscopy and, on the other hand, spectrophotometric reading of

nucleic acids gave values of approximately 0.001 for 1 g of cells compared with 0.2 in the control [23].

Taken together, these results indicate a low degree of cross-contamination in the different fractionation procedures.

### Subcellular K<sup>+</sup> distribution

Intracellular cation distribution was studied in wild-type yeast and vacuolar mutants. Our objective was to analyse a set of different mutants affected in vacuolar physiology. For that purpose, we selected two mutants lacking a cation transporter (*vnx1* and *nhx1*) and, to determine whether possible changes observed were due to the ion transport activity of these proteins or to general defects in vacuolar morphology, we included two other mutants for comparison: *ptc1* and *vam6*. These mutants also display alterations in vacuolar morphology, although these mutants are not expected to affect ion transport, the fact is that they are Na<sup>+</sup>/lithium (Li<sup>+</sup>)-sensitive [42–44]. All strains grew similarly in rich medium without potassium limitation (normal K<sup>+</sup> cells) (Figure 2A) and although *nhx1* mutants, lacking a K<sup>+</sup>(Na<sup>+</sup>)/H<sup>+</sup> antiporter located in prevacuolar and vacuolar membranes [45–47], showed a slight delay in growth, both the growth rate constant and maximum biomass yield were similar to those obtained

**Table 2 Total K<sup>+</sup> content in normal K<sup>+</sup> cells and in K<sup>+</sup>-starved cells**

Cells were grown in YPD (normal K<sup>+</sup> cells) or in YNB-F supplemented with 50 mM KCl and then starved for 4 h (K<sup>+</sup>-starved cells). Data are means ± S.E.M.. Different letters represent statistically significant differences among the strains under the same conditions (Tukey's test,  $P < 0.05$ ). \* denotes a highly significant difference by Tukey's test ( $P < 0.001$ ).

Strain	Total intracellular K <sup>+</sup> (nmol/mg of cells)	
	Normal K <sup>+</sup> cells	K <sup>+</sup> -starved cells
BY4741	564 ± 47 <sup>b</sup>	265 ± 14 <sup>c</sup>
Δ <i>ptc1</i>	558 ± 14 <sup>b</sup>	237 ± 14 <sup>b</sup>
Δ <i>vam6</i>	680 ± 40 <sup>*a</sup>	281 ± 29 <sup>c</sup>
Δ <i>vx1</i>	593 ± 40 <sup>b</sup>	209 ± 23 <sup>c</sup>
Δ <i>nhx1</i>	508 ± 25 <sup>a</sup>	202 ± 18 <sup>a</sup>

for the wild-type, *vam6*, *ptc1* and the *vx1* mutant, lacking the K<sup>+</sup>(Na<sup>+</sup>)/H<sup>+</sup> transporter in the tonoplast [9]. Under these growth conditions, total intracellular K<sup>+</sup> content was determined in all of the strains. It is worth highlighting that the *vam6* strain accumulated approximately 20% more K<sup>+</sup> than the wild-type with highly significant differences (Tukey's test,  $P < 0.001$ ) (Table 2). Intracellular distribution of the cation in wild-type cells showed that the vacuole was the intracellular compartment containing more K<sup>+</sup> (approximately 45% of the total). It is relevant that nuclei contained 29% of the total K<sup>+</sup> and only a minor amount of this cation was present in the mitochondria, Golgi apparatus and ER. (Figure 2B). Finally, it is important to mention that when complex YPD or synthetic YNB-F plus 50 mM KCl were used, growth rates were comparable (0.27 and 0.24 h<sup>-1</sup> respectively) (Figure 2A and [18]), as were intracellular K<sup>+</sup> concentrations (571 ± 38 and 564 ± 47 nmol/mg respectively) and K<sup>+</sup> distribution (results not shown).

We applied the same isolation procedure in four different vacuolar mutants. We first checked that the alterations in vacuoles of the mutants did not lead to different organellar yields. In general, the total protein yield was 38–42 mg/g of cells in all strains, and in all cases 15–17% corresponded to vacuolar proteins. The fact that, for example, ER proteins were 11–13% of total protein in all strains reinforced the idea that cell organelle isolation outcomes in all of the mutants was sufficiently similar to wild-type to ensure that the comparisons were sufficiently robust. Although affected in very different processes, all of them showed altered distribution of K<sup>+</sup> with decreased amounts of this cation in the vacuole and increased amounts in the cytosol. This redistribution was more relevant in the case of the two mutants affected in transport in which the cytosol accumulated even more K<sup>+</sup> than the vacuole. For example, in the *vx1* mutant, we measured 37% of internal K<sup>+</sup> in the cytosol and only 21% in the vacuole. Moreover, K<sup>+</sup> in the nuclei, mitochondria, Golgi apparatus and ER was not greatly affected by these mutations, although we observed an increase in K<sup>+</sup> in the mitochondrial fraction of the *ptc1* mutant (Figure 2B). Importantly, we did not observe increased amounts of vacuolar cross-contamination of other fractions in these mutants, suggesting that vacuolar integrity was not compromised during the extraction process. Moreover, we examined the isolated vacuoles from each of these strains microscopically and did not observe significant differences in the morphology of the purified vacuoles, thus discarding an artefact or vacuolar fragility.

In a subsequent experiment, we prepared K<sup>+</sup>-starved cells. Cells were grown in YNB-F supplemented with 50 mM KCl. After 4 h of incubation in the same medium without added K<sup>+</sup>, all strains lost more than 50% of their intracellular K<sup>+</sup> content (Table 2). Determination of the intracellular distribution of K<sup>+</sup>

revealed that vacuolar K<sup>+</sup> spectacularly decreased in wild-type cells and that the percentage in the cytosol was 3.3-fold higher than in normal K<sup>+</sup> cells, which means higher cytosolic K<sup>+</sup> amounts under starvation conditions. Therefore it is conceivable that K<sup>+</sup> was transported from the vacuole to the cytosol in order to fulfil cytosolic requirements. Finally, it is worth mentioning that the nuclei kept a similar percentage of K<sup>+</sup> after starvation (Figure 2C).

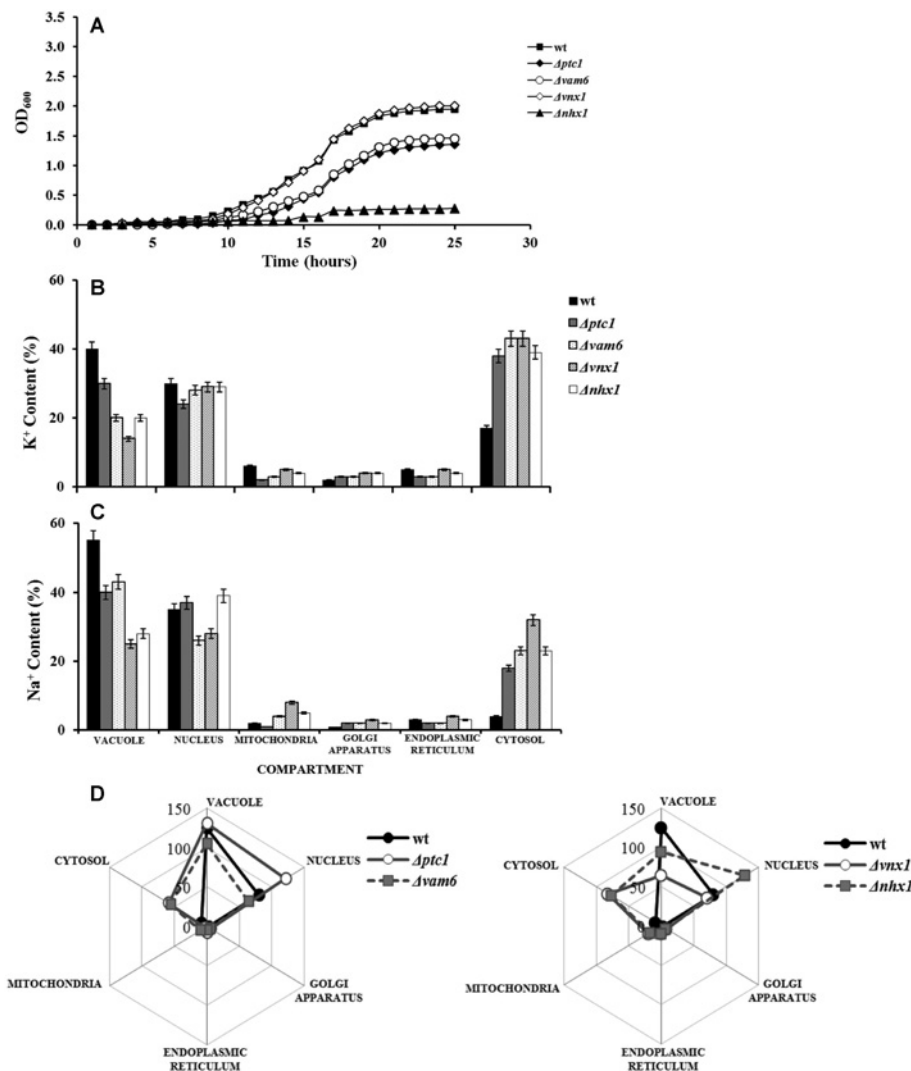
The general behaviour described above was also observed in all of the mutant strains. However, the changes in the vacuolar and cytosolic distribution of K<sup>+</sup> during starvation were much less relevant in the mutants, probably because of the impaired vacuolar physiology which probably leads to the observed decreased vacuolar and increased cytosolic K<sup>+</sup> concentrations before the starvation process (Figure 2C). Figure 2(D) shows radar graphs illustrating the quantitative changes in K<sup>+</sup> distribution after the K<sup>+</sup>-starvation process in the wild-type and the vacuolar mutants.

We next decided to use the wild-type strain to compare our results with those obtained with the most widely used procedure to determine intracellular cation distribution: plasma membrane permeabilization. This procedure is straightforward and less time consuming, but too simplistic since it focuses almost exclusively on vacuolar and cytoplasmic compartmentalization and tends to ignore the nuclear K<sup>+</sup> content contribution to total intracellular K<sup>+</sup>. Our parallel experiments, in which the plasma membrane was permeabilized with cytochrome *c*, on the one hand fit with previous observations showing the higher content of alkali cations in vacuoles of cells grown without K<sup>+</sup> limitation [13,16], since we measured 55/45% in 'vacuolar' and 'cytoplasmic' fractions of normal K<sup>+</sup> cells and, on the other hand, confirmed the drastic mobilization of vacuolar K<sup>+</sup> to the cytoplasm during the starvation process (28/72%) (results not shown).

### Subcellular Na<sup>+</sup> distribution

When the YPD medium was supplemented with 0.8 M NaCl ('Na<sup>+</sup> grown cells') we observed that while the wild-type and *vx1* mutant grew similarly, *vam6* and *ptc1* were slightly more affected and *nhx1* mutants lacking the vacuolar K<sup>+</sup>(Na<sup>+</sup>)/H<sup>+</sup> antiporter presented a severe growth impairment (Figure 3A). Under these conditions, all strains accumulated significant amounts of Na<sup>+</sup>, close to the K<sup>+</sup> values (Table 3). It is worth highlighting that the *nhx1* mutant, the strain showing poorer growth in the presence of Na<sup>+</sup>, was the only one in which total intracellular amounts of Na<sup>+</sup> were higher than those of K<sup>+</sup>. The next step was to analyse the intracellular cation distribution. Results in Figures 3(B) and 3(C) show that, also under these growth conditions, wild-type cells accumulated more cations in the vacuole than in the cytosol, and that this was much more significant in the case of Na<sup>+</sup>, which was kept at very low levels in the cytosol, suggesting a Na<sup>+</sup>-sequestering function for the vacuole. This function was also confirmed by parallel plasma membrane permeabilization experiments which indicated that approximately 60% of the total Na<sup>+</sup> was kept in the 'vacuolar fraction' (results not shown). Very interestingly, nuclei contained both Na<sup>+</sup> and K<sup>+</sup> in not very different amounts, which was not the case for wild-type mitochondria, Golgi apparatus or ER, which contained lower percentages of Na<sup>+</sup> than of K<sup>+</sup>. Once again, the four vacuolar mutants showed altered distribution of cations, containing less K<sup>+</sup> and Na<sup>+</sup> in the vacuoles and higher amounts of both cations in the cytosol. The ratio of vacuolar compared with cytosolic Na<sup>+</sup> clearly illustrates the defective cation distribution in these mutants: while this ratio was 13.7 for the wild-type, in the different mutants it reached values from 2.2 (*ptc1*) to 0.7 (*vx1*).





**Figure 3** Subcellular K<sup>+</sup> and Na<sup>+</sup> localization in wild-type and vacuolar mutants

(A) Growth curves of Na<sup>+</sup>-grown cells. Yeast cells were inoculated in YPD medium supplemented with 0.8 M NaCl at  $D_{600} = 0.01$  and a representative curve is shown. (B and C) Percentage relative to total intracellular K<sup>+</sup> (B) and Na<sup>+</sup> (C) located in vacuole, nucleus, mitochondria, Golgi apparatus, ER and cytosol. Data are means  $\pm$  S.E.M. for four independent experiments. (D) Radar graphs of quantitative Na<sup>+</sup> distribution (nmol/mg) in wild-type and vacuolar mutants.

Radar graphs of the Na<sup>+</sup> content in the wild-type and in the vacuolar mutants are shown in Figure 3(D). These results show that while the wild-type maintains a virtually Na<sup>+</sup>-free cytosol, all of the mutants contain higher amounts of Na<sup>+</sup> in the cytosol, being especially relevant in the case of the two mutants affected in transport (*vnx1* and *nhx1*).

## DISCUSSION

K<sup>+</sup> and Na<sup>+</sup> homeostasis are well-studied processes in yeast and intracellular values of these cations in *S. cerevisiae* wild-type and mutants grown under different conditions have been frequently reported [3]. However, less attention has been paid to the subcellular localization of these ions. The most widely used approach to this subject is the use of several substances that specifically permeabilize the plasma membrane. As mentioned above, although this procedure seems to be too simplistic, several groups have reported higher concentrations of K<sup>+</sup> in the vacuole than in the cytoplasm [13–15]. The results of the present study

**Table 3** Total K<sup>+</sup> and Na<sup>+</sup> content in Na<sup>+</sup>-grown cells

Cells were grown in YPD supplemented with 0.8 M NaCl. Data are means  $\pm$  S.E.M. Different letters represent statistically significant differences among the strains (Tukey's test,  $P < 0.05$ ).

Strain	Total intracellular K <sup>+</sup> and Na <sup>+</sup> in Na <sup>+</sup> -grown cells	
	K <sup>+</sup> (nmol/mg of cells)	Na <sup>+</sup> (nmol/mg of cells)
BY4741	260 $\pm$ 20 <sup>a</sup>	228 $\pm$ 19 <sup>a</sup>
$\Delta ptc1$	364 $\pm$ 28 <sup>c</sup>	328 $\pm$ 47 <sup>b</sup>
$\Delta vam6$	275 $\pm$ 12 <sup>a</sup>	245 $\pm$ 22 <sup>a</sup>
$\Delta vnx1$	322 $\pm$ 31 <sup>b</sup>	255 $\pm$ 19 <sup>a</sup>
$\Delta nhx1$	282 $\pm$ 46 <sup>a</sup>	334 $\pm$ 20 <sup>b</sup>

with wild-type cells grown under non-limiting K<sup>+</sup> conditions fit with this idea. Moreover, our results show that cytoplasmic values obtained by using cytochrome *c* were significantly higher than cytosolic values obtained by isolating organelles in both normal K<sup>+</sup> cells and K<sup>+</sup>-starved cells. These results suggest much higher

contamination of the cytoplasmic fraction coming from other organelles when the cytochrome *c* permeabilization process was used. We also demonstrate that the presence of significant amounts of  $K^+$  in the nucleus cannot be ignored, as reported by Roomans and Sevéus [12]. Vacuoles are the organelles which accumulate higher amounts of  $K^+$  and, in contrast, cytosolic  $K^+$  is relatively low. However, the amounts in the cytosol seem to be very important for cell physiology, i.e. regulation of enzymatic activities [48], as suggested by the extraordinary mobilization of vacuolar  $K^+$  to the cytosol during the starvation process in order to keep the levels constant. An open question that remains is the substrate accumulated by the vacuole in  $K^+$ -starved cells in order to keep osmotic potential since, in addition to the decrease in  $K^+$  content, cells lose high amounts of polyphosphates during the  $K^+$ -starvation process (D. Canadell and J. Ari o, personal communication).

In the case of  $Na^+$ -grown cells, the subcellular distribution of this cation was similar to what was observed for  $K^+$ , that is, higher amounts in the vacuole than in the cytosolic fraction. However, in this case,  $Na^+$  levels in the cytosol were kept especially low, reinforcing the idea of  $Na^+$  as a toxic element.

The four mutants used in the present study lack very different genes, but all of them have impaired vacuolar physiology. It is of note that all of them showed altered intracellular cation distribution. The four vacuolar mutants contained higher amounts of  $K^+$  in the cytosol and lower amounts in the vacuole. Specifically, both *nhx1* and *vnx1* were less effective in accumulating  $K^+$  in the vacuole, and *ptc1* and *vam6* showed a less-severe phenotype, supporting a specific role for the cation transport activity of *Nhx1* and *Vnx1* in intracellular cation distribution and validating our experimental procedure. These results indicate defective vacuolar accumulation and the absence of a possible sensing mechanism which would regulate  $K^+$  transport from the external medium to the cytoplasm. In addition, the four mutant strains showed a different response to  $K^+$  starvation than the wild-type strain. Moreover, none of these strains were able to maintain the very low cytosolic amounts of  $Na^+$  observed in the wild-type, although their  $Na^+$  sensitivity greatly varied from one mutant to another. This behaviour illustrates the complexity of the targets of  $Na^+$  sensitivity. In our hands, the *vnx1* mutant was not  $Na^+$ -sensitive, which is in agreement with previous reports [9], and the *ptc1* and *vam6* showed moderate sensitivity. In this respect, it is worth mentioning that in two genome-wide studies, the growth of *vam6* mutants was proposed to be unaffected [49] or to be very slightly inhibited [50] by  $NaCl$ . Finally, the most susceptible strain, the *nhx1* mutant, accumulated more intracellular  $Na^+$  than the wild-type, the  $K^+/Na^+$  ratio was the lowest and, in addition, an important percentage of this  $Na^+$  was in the cytosol, which most probably is linked to its sensitive character. At this point it is worth commenting that *Nhx1* regulates membrane fusion of endosomal vesicles and acidification of cytosol and vacuole lumen [46]. In summary, although the underlying reason may be different depending on the mutation, the fact is that all of the mutants showed altered vacuolar cation content and problems to adapt to changes in external medium.

From a general point of view, the cation content in other organelles such as mitochondria, Golgi apparatus and ER was relatively low and constant under the different conditions used in the present study. We cannot completely rule out the possibility of some  $K^+$  loss during the cell homogenization in the case of the ER or Golgi; however, it seems to be reasonable to expect low amounts of  $K^+$  in these organelles and the results of the present study appear coherent with this idea and with the whole set of data obtained. The possibility of significant amounts of  $K^+$  in yeast nuclei has usually been overlooked, although Roomans

and Sevéus [12] did mention it in their pioneering paper in 1976. We now show that nuclei from wild-type cells contain approximately one-third of the intracellular  $K^+$  and  $Na^+$  and that this amount is kept quite constant in all of the vacuolar mutants studied and is independent of the external conditions ( $K^+$  starvation or the presence of  $Na^+$ ). Apparently, it does not matter if the cell uses  $K^+$  or  $Na^+$ , since in  $Na^+$ -grown cells, both  $K^+$  and  $Na^+$  are present. Nuclear pores are big enough to allow  $K^+$  and  $Na^+$  leak; however, our measurements suggest that important amounts of these cations are found in nuclear fractions and it is tempting to propose that they can be used to neutralize part of the negative charges in this organelle, as has been previously proposed in mammalian cells where  $Na^+$  and  $K^+$  have been directly implicated in chromosome structure through electrostatic neutralization and a functional interaction with non-histone proteins [51].

Finally we would like to highlight that we have established a robust and optimized procedure to determine subcellular cation localization in yeast that can be used to analyse wild-type cells under several external conditions and many different mutants affected in cation homeostasis that are not sufficiently understood at present.

## AUTHOR CONTRIBUTION

Rito Herrera contributed to the experimental design, carried out the experiments and analysed the results. María Álvarez contributed to the design of the research, helped with the organelle isolation procedure and analysed the results. Samuel Gelis helped with the interpretation of the data, scientific discussion and writing the paper. José Ramos conceived and designed the study, supervised the project and wrote the paper with input from all of the authors.

## ACKNOWLEDGEMENTS

We thank L. Yenush and J. Ari o for critical comments, D. Canadell and J. Ari o for sharing information on intracellular polyphosphates, and the Translucent Consortium for many useful discussions. We also thank S. Demyda, F. Calahorra, and the groups of M.M. Malag n and J.M. Villalba for technical advice.

## FUNDING

This work is a part of TRANSLUCENT-2, a SysMo ERA-NET funded Research project and was supported by the Ministry of Science and Innovation, Spain [grant numbers BFU2008-04188-C03-03 and EUI 2009-04153 (to J.R.)]. R.H. is a recipient of a Panama Government fellowship (SENACYT-IFARHU).

## REFERENCES

- Mulet, J. M., Leube, M. P., Kron, S. J., Rios, G., Fink, G. R. and Serrano, R. (1999) A novel mechanism of ion homeostasis and salt tolerance in yeast: the Hal4 and Hal5 protein kinases modulate the Trk1-Trk2 potassium transporter. *Mol. Cell. Biol.* **19**, 3328–3337
- Rodríguez-Navarro, A. (2000) Potassium transport in fungi and plants. *Biochim. Biophys. Acta* **1469**, 1–30
- Ari o, J., Ramos, J. and Sychrova, H. (2010) Alkali metal cation transport and homeostasis in yeasts. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **74**, 95–120
- Fell, G. L., Munson, A. M., Croston, M. A. and Rosenwald, A. G. (2011) Identification of yeast genes involved in  $K^+$  homeostasis: loss of membrane traffic genes affects  $K^+$  uptake. *G3: Genes, Genomes, Genet.* **1**, 43–56
- Barreto, L., Canadell, D., Petrezselyova, S., Navarrete, C., Maresova, L., Perez-Valle, J., Herrera, R., Olier, I., Giraldo, J., Sychrova, H. et al. (2011) A genomewide screen for tolerance to cationic drugs reveals genes important for potassium homeostasis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryotic Cell* **10**, 1241–1250
- Tuteja, N. (2007) Mechanisms of high salinity tolerance in plants. *Methods Enzymol.* **428**, 419–438
- Jiang, X., Leidi, E. O. and Pardo, J. M. (2010) How do vacuolar NHX exchangers function in plant salt tolerance? *Plant Signaling Behav.* **5**, 792–795

- 8 Brett, C. L., Tukaye, D. N., Mukherjee, S. and Rao, R. (2005) The yeast endosomal  $\text{Na}^+$  ( $\text{K}^+$ )/ $\text{H}^+$  exchanger Nhx1 regulates cellular pH to control vesicle trafficking. *Mol. Biol. Cell* **16**, 1396–1405
- 9 Cagnac, O., Leterrier, M., Yeager, M. and Blumwald, E. (2007) Identification and characterization of Vnx1p, a novel type of vacuolar monovalent cation/ $\text{H}^+$  antiporter of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **282**, 24284–24293
- 10 Cagnac, O., Aranda-Sicilia, M. N., Leterrier, M., Rodríguez-Rosales, M. P. and Venema, K. (2010) Vacuolar cation/ $\text{H}^+$  antiporters of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **285**, 33914–33922
- 11 Zotova, L., Aleschko, M., Sponder, G., Baumgartner, R., Reipert, S., Prinz, M., Schweyen, R. J. and Nowikovsky, K. (2010) Novel components of an active mitochondrial  $\text{K}^+$ / $\text{H}^+$  exchange. *J. Biol. Chem.* **285**, 14399–14414
- 12 Roomans, G. M. and Sevéus, L. A. (1976) Subcellular localization of diffusible ions in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: quantitative microprobe analysis of thin freeze-dried sections. *J. Cell Sci.* **21**, 119–127
- 13 Okorokov, L. A., Lichko, L. P. and Kulaev, I. S. (1980) Vacuoles: main compartments of potassium, magnesium, and phosphate ions in *Saccharomyces carlsbergensis* cells. *J. Bacteriol.* **144**, 661–665
- 14 Venema, K., Belver, A., Marin-Manzano, M. C., Rodríguez-Rosales, M. P. and Donaire, J. P. (2003) A novel intracellular  $\text{K}^+$ / $\text{H}^+$  antiporter related to  $\text{Na}^+$ / $\text{H}^+$  antiporters is important for  $\text{K}^+$  ion homeostasis in plants. *J. Biol. Chem.* **278**, 22453–22459
- 15 Montiel, V. and Ramos, J. (2007) Intracellular Na and K distribution in *Debaryomyces hansenii*. Cloning and expression in *Saccharomyces cerevisiae* of *DhNHX1*. *FEMS Yeast Res.* **7**, 102–109
- 16 Perkins, J. and Gadd, G. M. (1993) Accumulation and intracellular compartmentation of lithium ions in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol. Lett.* **107**, 255–260
- 17 de Nadal, E., Calero, F., Ramos, J. and Ari o, J. (1999) Biochemical and genetic analyses of the role of yeast casein kinase 2 in salt tolerance. *J. Bacteriol.* **181**, 6456–6462
- 18 Navarrete, C., Petre selyova, S., Barreto, L., Martínez, J. L., Zahradka, J., Ari o, J., Sychrova, H. and Ramos, J. (2010) Lack of main  $\text{K}^+$  uptake systems in *Saccharomyces cerevisiae* cells affects yeast performance in both potassium-sufficient and potassium-limiting conditions. *FEMS Yeast Res.* **10**, 508–517
- 19 Ohsumi, Y. and Anraku, Y. (1981) Active transport of basic amino acids driven by a proton motive force in vacuolar membrane vesicles of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **256**, 2079–2082
- 20 Martínez-Muñoz, G. A. and Peña, A. (2005) *In situ* study of  $\text{K}^+$  transport into the vacuole of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **22**, 689–704
- 21 Bradford, M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248–254
- 22 Onken, H. and Putzenlechner, M. (1995) A V-ATPase drives active, electrogenic and  $\text{Na}^+$ -independent  $\text{Cl}^-$  absorption across the gills of *Eriocheir sinensis*. *J. Exp. Biol.* **198**, 767–774
- 23 Zhang, Z. and Reese, J. (2006) Isolation of yeast nuclei and micrococcal nuclease mapping of nucleosome positioning. In *Yeast Protocols* (Xiao, W., ed.), pp. 245–255, Humana Press, New Jersey
- 24 Prescott, S. and Breed, R. (1910) The determination of the number of body cells in milk by a direct method. *J. Infect. Dis.* **7**, 632
- 25 Zotova, L., Aleschko, M., Sponder, G., Baumgartner, R., Reipert, S., Prinz, M., Schweyen, R. J. and Nowikovsky, K. (2010) Novel components of an active mitochondrial  $\text{K}^+$ / $\text{H}^+$  exchange. *J. Biol. Chem.* **285**, 14399–14414
- 26 Yonetani, T. (1965) Studies on cytochrome c peroxidase. II. Stoichiometry between enzyme,  $\text{H}_2\text{O}_2$ , and ferrocytochrome c and enzymic determination of extinction coefficients of cytochrome c. *J. Biol. Chem.* **240**, 4509–4514
- 27 Trounce, I. A., Kim, Y. L., Jun, A. S. and Wallace, D. C. (1996) Assessment of mitochondrial oxidative phosphorylation in patient muscle biopsies, lymphoblasts, and transmittochondrial cell lines. *Methods Enzymol.* **264**, 484–509
- 28 Capaldi, R. A., Marusich, M. F. and Taanman, J. W. (1995) Mammalian cytochrome c oxidase: characterization of enzyme and immunological detection of subunits in tissue extracts and whole cells. *Methods Enzymol.* **260**, 117–132
- 29 Antebi, A. and Fink, G. (1992) The yeast  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase homologue, PMR1, is required for normal Golgi function and localizes in novel Golgi-like distribution. *Mol. Biol. Cell* **3**, 633–654
- 30 Herrero, A. B., Uccelletti, D., Hirschberg, C. B., Dominguez, A. and Abeijon, C. (2002) The Golgi GDPase of the fungal pathogen *Candida albicans* affects morphogenesis, glycosylation, and cell wall properties. *Eukaryotic Cell* **1**, 420–431
- 31 Daum, G. and Palttauf, F. (1984) Isolation and partial characterization of a phospholipid transfer protein from yeast cytosol. *Biochim. Biophys. Acta* **794**, 385–391
- 32 Hames, B. D. and Higgins, S. J. (1985) *Nucleic Acid Hybridization: A Practical Approach*, pp. 179–202, IRL Press, Oxford
- 33 Ramos, J., Haro, R. and Rodríguez-Navarro, A. (1990) Regulation of potassium fluxes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim. Biophys. Acta* **1029**, 211–217
- 34 Lang, B., Burger, G., Doxiadis, I., Thomas, D. Y., Bandlow, W. and Kaudewitz, F. (1977) A simple method for the large-scale preparation of mitochondria from microorganisms. *Anal. Biochem.* **77**, 110–121
- 35 Zuily-Fodil, Y., Passaquet, C. and Esnault, R. (1978) High yield isolation of nuclei from plant protoplasts. *Physiol. Plant.* **43**, 201–204
- 36 Kringstad, R., Kenyon, W. H. and Black, C. C. (1980) The rapid isolation of vacuoles from leaves of crassulacean acid metabolism plants. *Plant Physiol.* **66**, 379–382
- 37 Rott, R. and Nelson, N. (1981) Purification and immunological properties of proton-ATPase complexes from yeast and liver mitochondria. *J. Biol. Chem.* **256**, 9224–9292
- 38 Gonzalez-Barroso, M. M., Ledesma, A., Lepper, S., Pérez-Magan, E., Zaragoza, P. and Rial, E. (2006) Isolation and bioenergetic characterization of mitochondria from *Pichia pastoris*. *Yeast* **23**, 307–313
- 39 Depierre, J. and Dallner, G. (1975) Structural aspects of the membrane of the endoplasmic reticulum. *Biochim. Biophys. Acta* **415**, 411–472
- 40 Schenkman, J. B. and Cinti, E. L. (1978) Preparation of microsomes with calcium. *Methods Enzymol.* **52**, 83–89
- 41 Yanagisawa, K., Resnick, D., Abeijon, C., Robbins, P. and Hirschberg, C. (1990) A guanosine diphosphatase enriched in Golgi vesicles of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **265**, 19351–19355
- 42 Price, A., Seals, D., Wickner, W. and Ungermann, C. (2000) The docking stage of yeast vacuole fusion requires the transfer of proteins from a cis-SNARE complex to a Rab/Ypt protein. *J. Cell Biol.* **148**, 1231–1238
- 43 Bonangelino, C. J., Chavez, E. M. and Bonifacino, J. S. (2002) Genomic screen for vacuolar protein sorting genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Biol. Cell* **13**, 2486–2501
- 44 Ari o, J., Casamayor, A. and Gonzalez, A. (2011) Type 2C protein phosphatases in fungi. *Eukaryotic Cell* **10**, 21–33
- 45 Brett, C. L., Tukaye, D. N., Mukherjee, S. and Rao, R. (2005) The yeast endosomal  $\text{Na}^+$  ( $\text{K}^+$ )/ $\text{H}^+$  exchanger Nhx1 regulates cellular pH to control vesicle trafficking. *Mol. Biol. Cell* **16**, 1396–1405
- 46 Qiu, Q. S. and Fratti, R. A. (2010) The  $\text{Na}^+$ / $\text{H}^+$  exchanger Nhx1p regulates the initiation of *Saccharomyces cerevisiae* vacuole fusion. *J. Cell Sci.* **123**, 3266–3275
- 47 Hernandez, A., Jiang, X., Cubero, B., Nieto, P. M., Bressan, R. A., Hasegawa, P. M. and Pardo, J. M. (2009) Mutants of the *Arabidopsis thaliana* cation/ $\text{H}^+$  antiporter AtNHX1 conferring increased salt tolerance in yeast: the endosome/prevacuolar compartment is a target for salt toxicity. *J. Biol. Chem.* **284**, 14276–14285
- 48 Page, M. J. and Di Cera, E. (2006) Role of  $\text{Na}^+$  and  $\text{K}^+$  in enzyme function. *Physiol. Rev.* **86**, 1049–1092
- 49 Gustavsson, M., Barmark, G., Larsson, J., Mur n, E. and Ronne, H. (2008) Functional genomics of monensin sensitivity in yeast: implications for post-Golgi traffic and vacuolar  $\text{H}^+$ -ATPase function. *Mol. Genet. Genomics* **280**, 233–248
- 50 Warringer, J., Ericson, E., Fernandez, L., Nerman, O. and Blomberg, A. (2003) High-resolution yeast phenomics resolves different physiological features in the saline response. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **100**, 15724–15729
- 51 Strick, R., Strissel, P. L., Gavrilov, K. and Levi-Setti, R. (2001) Cation-chromatin binding as shown by ion microscopy is essential for the structural integrity of chromosomes. *J. Cell Biol.* **155**, 899–910

Received 28 January 2013/13 June 2013; accepted 5 July 2013

Published as BJ Immediate Publication 5 July 2013, doi:10.1042/BJ20130143



## Role of *Saccharomyces cerevisiae* Trk1 in stabilization of intracellular potassium content upon changes in external potassium levels

Rito Herrera<sup>a,1</sup>, María C. Álvarez<sup>a,1</sup>, Samuel Gelis<sup>a</sup>, Marie Kodedová<sup>b</sup>, Hana Sychrová<sup>b</sup>, Maik Kschischo<sup>c</sup>, José Ramos<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Departamento de Microbiología, Universidad de Córdoba, Córdoba, Spain

<sup>b</sup> Department of Membrane Transport, Institute of Physiology AS CR, v.v.i., Prague, Czech Republic

<sup>c</sup> Department of Mathematics and Technology, RheinAhrCampus, University of Applied Sciences, Koblenz, Remagen, Germany

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 16 April 2013

Received in revised form 29 August 2013

Accepted 30 August 2013

Available online xxx

#### Keywords:

*Saccharomyces cerevisiae*

Trk transporter

Intracellular potassium

Non-perfect adaptation

### ABSTRACT

*Saccharomyces cerevisiae* cells are able to grow at very different potassium concentrations adapting its intracellular cation levels to changes in the external milieu. Potassium homeostasis in wild type cells resuspended in media with low potassium is an example of non-perfect adaptation since the same intracellular concentration is not approached irrespective of the extracellular levels of the cation. By using yeasts lacking the Trk1,2 system or expressing different versions of the mutated main plasma membrane potassium transporter (Trk1), we show that Trk1 is not essential for adaptation to potassium changes but the dynamics of potassium loss is very different in the wild type and in *trk1,2* mutant or in yeasts expressing Trk1 versions with highly impaired transport characteristics. We also show that the pattern here described can be also fulfilled by heterologous expression of *NcHAK1*, a potassium transporter not belonging to the TRK family. Hyperpolarization and cationic drugs sensitivity in mutants with defective transport capacity provide additional support to the hypothesis of connections between the activity of the Trk system and the plasma membrane H<sup>+</sup> ATPase (Pma1) in the adaptive process.

© 2013 Published by Elsevier B.V.

### 1. Introduction

Potassium is required by all living cells and it is essential for the proper function of many cellular processes that are critical for physiological parameters such as membrane potential, intracellular pH or cell volume. The model yeast *Saccharomyces cerevisiae* is able to grow in the presence of a broad range of external K<sup>+</sup>-concentrations and the adaptation of intracellular cation levels to changes in the external milieu requires the coordinated regulation of at least 10 different alkali metal cation-specific transporters [1]. However, the exact mechanism of this homeostatic regulation of transport activity is still not sufficiently understood.

In particular, the activity of ScTrk1, the main plasma membrane potassium transporter, is tightly regulated. Both the V<sub>max</sub> and the affinity of the transporter increase strongly with decreasing potassium concentrations. In addition, mutants lacking the system show increased potassium requirements and impaired transport characteristics [2–4]. The existence of another Trk protein (Trk2) was later found out in *S. cerevisiae*, but it seems to play a minor role in potassium homeostasis [5,6]. Probably as a consequence of the defective potassium transport observed in the mutants, a low content of K<sup>+</sup> in *trk1,2* strains grown at low K<sup>+</sup> has also been reported [7]. In turn, differences between wild type and

*trk1,2* strains in membrane potential and antibiotic resistance have been early documented [8,9].

TRK type transporters are present in fungi and plants and their general structure is based on four M1PM2 motifs being M2<sub>D</sub> helix unique with abundant positively charged amino acid residues, most probably forming part of the pore segment of the transporter and interacting with P segments [10–13].

The existence of elements sensing nutrients or regulating cell wall integrity and triggering signaling pathways has been proposed [14] although nothing has been reported about specific sensors of cations such as potassium or sodium and little is known about processes involved in the adaptation to changes in external potassium. By following a multidisciplinary approach, we have recently concluded that potassium homeostasis in wild type cells is an example of non-perfect adaptation, since the same intracellular concentration (output) is not approached irrespective of the extracellular levels (input). In addition we have shown that activation of Pma1 and bicarbonate systems is involved in the responses to potassium starvation [15]. However, the detailed sensing and signaling mechanism regulating potassium fluxes and intracellular stable potassium levels remains to be elucidated.

Haro and Rodríguez-Navarro reported in 2003 a mutational analysis of the M2<sub>D</sub> helix of the ScTrk1 transporter. They showed that single mutations affected the capacity of K<sup>+</sup> (Rb<sup>+</sup>) transport in very different degrees, but the introduction of only one positively charged residue practically abolished the function of the transporter [13]. In this paper we have used *trk* mutants to study the adaptation to a decrease of the

\* Corresponding author at: Departamento de Microbiología, Universidad de Córdoba, 14071-Córdoba, Spain. Tel.: +34 957212527.

E-mail address: [mi1raruj@uco.es](mailto:mi1raruj@uco.es) (J. Ramos).

<sup>1</sup> These authors contributed equally to the work.

external potassium in yeast cells lacking the Trk system or expressing different versions of the mutated Trk1 protein. We conclude that, although Trk1 is not essential for adaptation to potassium changes, the dynamics of potassium loss is very different in the wild type and in *trk1,2* mutant or in yeasts expressing Trk1 versions with highly impaired transport characteristics.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Strains and growth conditions

The *S. cerevisiae* wild type W303.1A (*Mata, ade2, ura3, leu2, his3, trp1*; EUROSCARF; Germany) and the isogenic double mutant WΔ6 (*trk1Δ::LEU2 trk2Δ::HIS3*), have been used in this work. Both strains were transformed with the empty plasmid pFL38. Moreover, WΔ6 was transformed with pFL38-derivated plasmids carrying different constructions of *TRK1*: ScTRK1 (original Trk1 transporter), K1147N and M1153R [13]. In an additional experiment, WΔ6 was transformed with NcHAK1 cloned into the pYPGE15 yeast expression vector [16]. Yeast cultures were routinely grown at 28 °C in YNB-Translucent K<sup>+</sup>-free medium with appropriate auxotrophic supplements (FORMEDIUM™), and the indicated amount of KCl (pH 5.8). Solid media were prepared by adding 2% (w/v) agar [17]. Potassium requirements and cationic drugs sensitivity were studied by analyzing growth on the same YNB-Translucent medium or YPD (1% (w/v) yeast extract, 2% (w/v) peptone, 2% (w/v) glucose) plates supplemented with several potassium concentrations or with the indicated amount of the drug. Cell O.D.<sub>600</sub> was adjusted to 0.1 and plates were inoculated with serial 10-fold dilutions of these cultures and incubated at 28 °C during 48 h.

### 2.2. Determination of stationary internal concentrations and dynamics of potassium loss

To determine the stationary internal concentration of potassium, cells were grown in Translucent K<sup>+</sup>-free medium supplemented with

the indicated amount of KCl during 18–36 h. When O.D.<sub>600</sub> reached values of 0.2–0.4, cell samples were collected on Millipore filters, which were rapidly washed with 20 mM MgCl<sub>2</sub>. The cells were then extracted with acid and potassium content analyzed by atomic emission spectrophotometry [18]. The experiments were repeated at least three times and the SDs calculated.

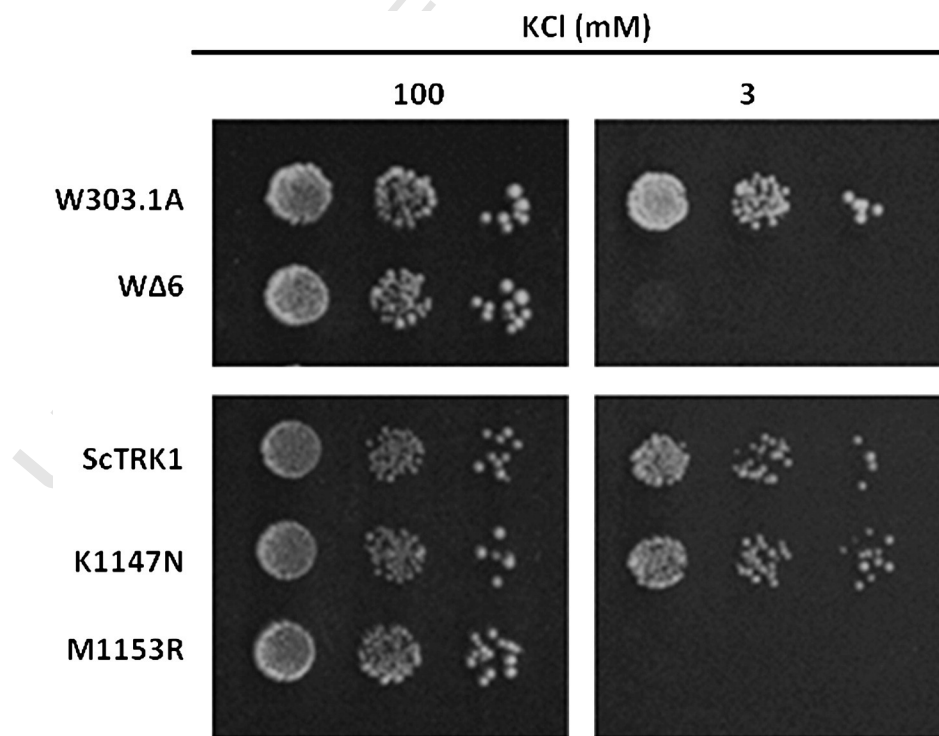
The time course of potassium loss was studied by resuspending 100 mM KCl grown cells in the same Translucent medium containing the indicated KCl concentrations [15]. Cell samples were collected at different times and potassium content was measured as described above. Experiments were repeated at least three times and the SDs calculated.

### 2.3. Cell volume determination

Cell volume was analyzed in a Cell Counter Z2 (Beckman-Coulter) and expressed in femtoliters (fL) [17]. The experiment was repeated at least three times, each time 6 × 10<sup>4</sup> cells were analyzed for each strain and each condition.

### 2.4. Fluorescence measurement of membrane potential (*diS-C<sub>3</sub>(3)* assay)

The membrane potential of yeast cells was estimated by fluorescence assay based on the redistribution of the fluorescence probe *diS-C<sub>3</sub>(3)* (3,3'-dipropylthiobarbituric acid iodide; 0.1 mM stock solution in ethanol) [19,20]. Cells were inoculated in YNB-F medium containing 100 mM KCl, harvested during exponential phase of growth, washed twice with distilled water and resuspended in assay buffer (10 mM MES buffer, pH 6.0 adjusted by triethanolamine) to O.D.<sub>600</sub> of 0.1 and the probe was added to a final concentration of 0.2 μM. Fluorescence emission spectra of the cell suspensions were measured every 4–6 min on ISS PC1 spectrofluorimeter equipped with a xenon lamp. Excitation wavelength was 531 nm, emission range 560–590 nm, duration of one spectral scan 20 s. Scattered light was eliminated by an emission filter with a cutoff wavelength at 540 nm. Samples were kept at room temperature and occasionally gently stirred. The staining



**Fig. 1.** Growth in low potassium depends on an efficient Trk1 version. Potassium requirements of wild type (W303.1A), double *trk1,2* mutant (WΔ6), and yeasts with different versions of Trk1 (see text) were pre-grown in YNB-F synthetic medium (pH 5.8) containing 100 mM KCl. Serial 10-fold dilutions were spotted on the same YNB-F medium plus KCl at the indicated concentrations. Cells were incubated at 28 °C for 2 days.



146 curves recorded the dependence of fluorescence emission maximum  
147 wavelength  $\lambda_{\max}$  on the time of staining [21].

### 148 3. Results

149 To characterize the behavior of the different yeast, strains we  
150 performed growth tests in YNB-Translucent medium supplemented  
151 with several  $K^+$  concentrations (Fig. 1). All strains grew similarly well  
152 in solid media and at non limiting  $K^+$  (100 mM KCl). However, at low  
153  $K^+$  (3 mM KCl), impaired growth of the *trk1,2* mutant was observed.  
154 Expression of a wild type *TRK1* in the double *trk1,2* mutant improved  
155 the performance at limiting  $K^+$  (ScTRK1). Yeasts transformed with the  
156 K1147N version of *TRK1* carrying a substitution of a lysine by an aspar-  
157 argine in the M2<sub>D</sub> helix had still a Vmax approximately half of the wild  
158 type's Vmax and were able to grow at low potassium. On the contrary,  
159 yeasts carrying version M1153R of the transporter (substitution of a  
160 methionine by an arginine) with almost no detectable high affinity  
161 transport behaved very similar to the double *trk* mutant and did not  
162 grow on plates with 3 mM KCl.

#### 163 3.1. Role of the main plasma membrane potassium transporter in adaptation 164 to changes in external potassium concentrations

165 We have recently published that intracellular potassium adjustment  
166 is an example of non-perfect adaptation: Wild type yeasts maintain a  
167 certain amount of internal potassium even at relatively low external  
168 concentrations. In addition, the internal potassium concentration of  
169 wild type cells depends at least partially on the external concentration.  
170 Cells resuspended from 50 mM potassium into media of lower external  
171 potassium had, after a transient period of potassium loss, a constant in-  
172 tracellular potassium concentration identical (within experimental  
173 error) to the concentration of cells grown overnight in these external  
174 concentration. These experiments showed, that after some relaxation  
175 time the intracellular potassium concentration attains a stationary  
176 value that is independent of the history of the cell and no hysteresis ef-  
177 fects are observable. However, the adaptation to external potassium is  
178 not perfect in the sense that this steady state is influenced by the external  
179 concentration.

180 We wondered whether the lack of the main plasma membrane po-  
181 tassium transporters would affect that adaptive process. Therefore we  
182 grew our wild type and *trk1,2* mutant strains at non limiting KCl concen-  
183 trations and resuspended them in media with several external potas-  
184 sium concentrations. Results in Fig. 2A and B show that wild type and  
185 double mutant were able to adapt to external changes, but, at low potas-  
186 sium, stationary internal concentrations were different in the two  
187 strains. Interestingly, the initial rate of change of internal  $K^+$  (between  
188 0 and 60 min) appears to be, in fact, higher for wild type than for  
189 *trk1,2* strains at 0,3 and 0,5 mM. This pattern seems to be consistent  
190 with the claim that enhanced hyperpolarization helps the cells to retain  
191  $K^+$ . Supplementary Fig. 1 shows the time course of changes in  $OD_{600}$   
192 (growth) after resuspension of wild type (A) and *trk1,2* (B) in media  
193 with lower potassium amounts. As expected, mutant cells resulted  
194 much more affected than wild type cells. We tested in our genetic back-  
195 ground whether these stationary intracellular concentrations depend  
196 on the initial conditions or are determined solely by the external con-  
197 centrations, we grew cells overnight in media with different external  
198 potassium concentrations (Fig. 2C). In both wild type and mutant  
199 strains the intracellular potassium concentration is limited to approx.  
200 500 nmol/mg ( $497 \pm 21$  and  $510 \pm 28$ , respectively) when the external  
201 potassium concentration is high enough (100 mM). For low external  
202 potassium, the internal concentration is proportional to the external  
203 and, in the wild type, agrees with the stationary states of Fig. 2A. The  
204 decline of internal  $K^+$ -concentration was greater for *trk1,2* than for wild  
205 type cells long-term exposed to a low external  $K^+$  concentration  
206 (0.3–1 mM) (compare the time course in Fig. 2A and B for external con-  
207 centrations between 0.3 and 1 mM KCl). In contrast to the wild type,

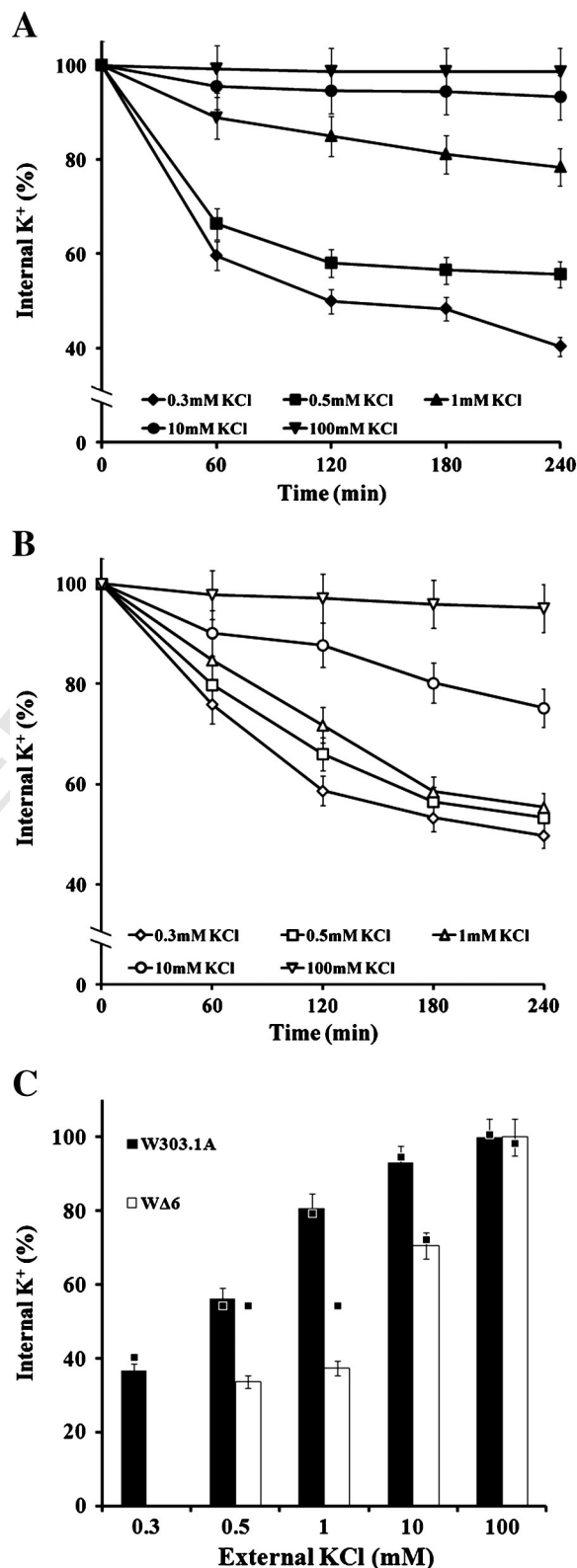


Fig. 2. Relationship of external and internal potassium in wild type and double *trk1,2* mutant. W303.1A (A) and WΔ6 (B) strains grown in 100 mM KCl were resuspended in several KCl concentrations and the time course of internal potassium was monitored. (C) Internal potassium concentration in wild type and double mutant strains grown overnight at different external potassium concentrations. The steady state concentrations from (A) and (B) are indicated as squares. At 0.3 mM KCl the *trk1,2* strain did not grow to allow internal potassium measurements. Experiments were repeated at least three times and the SDs calculated.

208 *trk1,2* cells grown overnight at these limiting external concentrations (0.5-1 mM), contained a slight but significant lower amount of potassium suggesting impaired adaptation to reach the respective stable stationary states when grown at non limiting potassium and resuspended in low concentrations of the cation. As an example, wild type cells incubated 4 h or grown overnight in 1 mM KCl contained around 80% of the potassium in cells grown under non limiting conditions while *trk1,2* mutant cells contained around 55% when incubated 4 h in 1 mM KCl and only 37% when grown overnight under these conditions. At 0.3 mM KCl the double mutant did not grow at all and we did not get enough biomass for the experiment (Fig. 2C).

219 These results suggest an important role of the Trk1,2 system in the adaptation to low external potassium. Cells lacking the Trk1,2 system are able to adapt to low external potassium but the stationary intracellular concentrations depend on the initial conditions. This effect might be related to defective transport and/or lack of Trk1,2 dependent signaling activity. To gain insight into the possible relationship between the function of the Trk system in potassium transport and in potassium adjustment at different external potassium levels, we repeated the same kind of experiments using our double mutant transformed

228 with plasmids carrying different versions of *TRK1* (Fig. 3). As expected from the results above, the different strains grown under non-limiting potassium contained similar amounts of the cation ( $519 \pm 21$ ,  $496 \pm 29$  and  $511 \pm 20$  nmol/mg in yeasts expressing wild type, K1147N or M1153R versions of Trk1 respectively). When resuspended in media with lower amounts of KCl, all yeasts were able to adapt their intracellular potassium levels to the external concentrations. However, the transport capacity and not the sole presence of Trk1 determines the stationary internal concentrations. The strains expressing wild type or K1147N version of Trk1 behaved similarly to the wild type and yeasts carrying version M1153R of the transporter behaved similarly to the double *trk* mutant (compare Figs. 2 and 3). Similarly to what was shown in Supplementary Fig. 1, Supplementary Fig. 2 shows the time course of changes in OD<sub>600</sub> after resuspension of yeasts expressing ScTrk1 (A), K1147N (B) or M1153R (C) in media with lower potassium concentrations. Likewise to what was mentioned above for the wild type and the double mutant, cells expressing ScTrk1 or the K1147N version contained around 80% of the maximum potassium when incubated 4 h (Fig. 3A and B) or grown overnight in 1 mM KCl (Fig. 3D) and, on the other hand, cells expressing the M1153R version of Trk1 contained

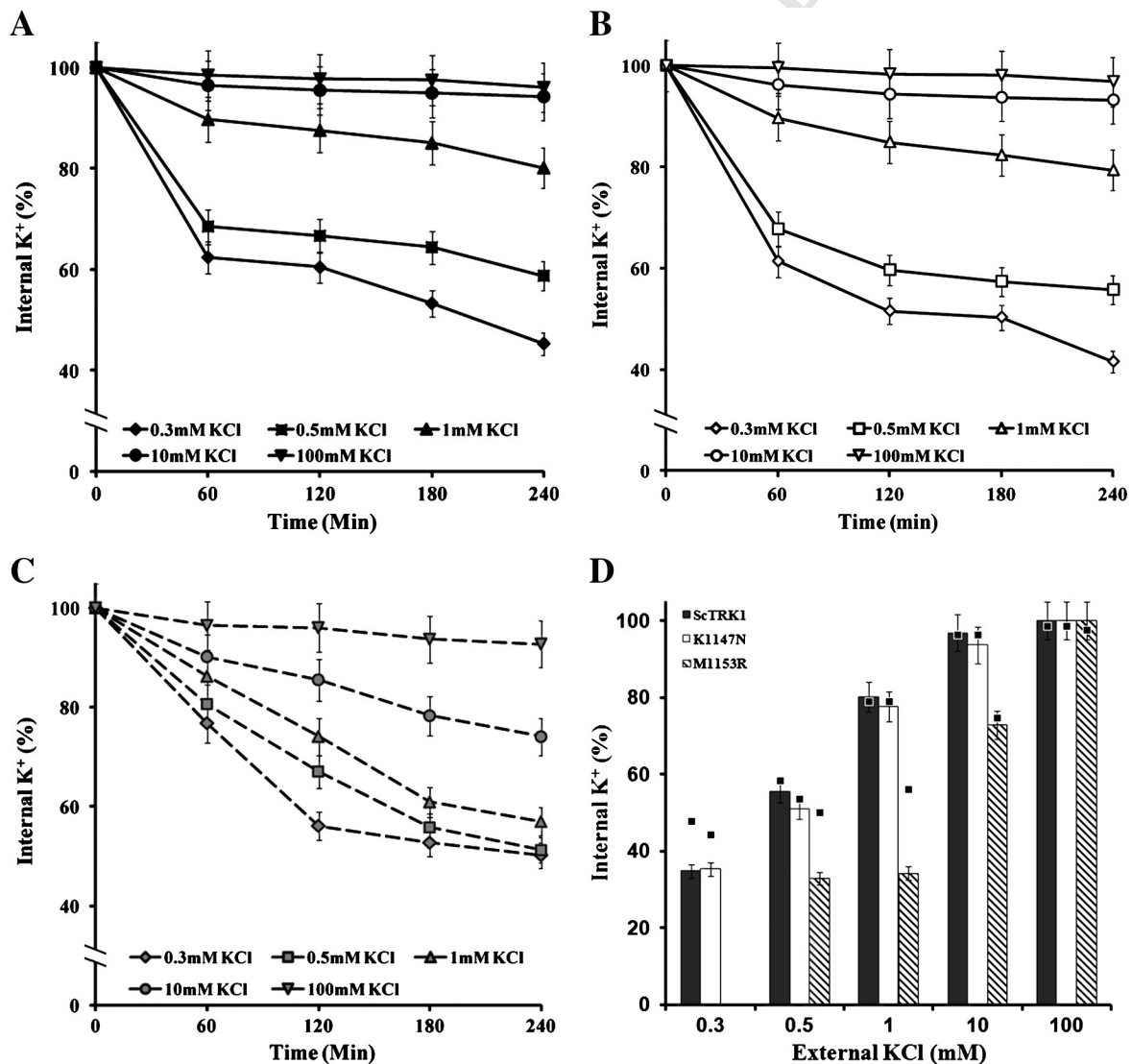


Fig. 3. Relationship of external and internal potassium in cells carrying different versions of Trk1. WA6 transformed with ScTRK1 (A), K1147N (B) or M1153R (C) was grown in 100 mM KCl, resuspended in several KCl concentrations and the time course of internal potassium was monitored. (D) Internal potassium concentration in yeasts carrying ScTRK1, K1147N or M1153R grown overnight at different external potassium concentrations. The steady state concentrations from (A), (B) and (C) are indicated as squares. At 0.3 mM KCl the cells carrying M1153R did not grow to allow internal potassium measurements. Experiments were repeated at least three times and the SDs calculated.

around 57% when incubated 4 h in 1 mM KCl (Fig. 3C) and 34% when grown under these conditions (Fig. 3D).

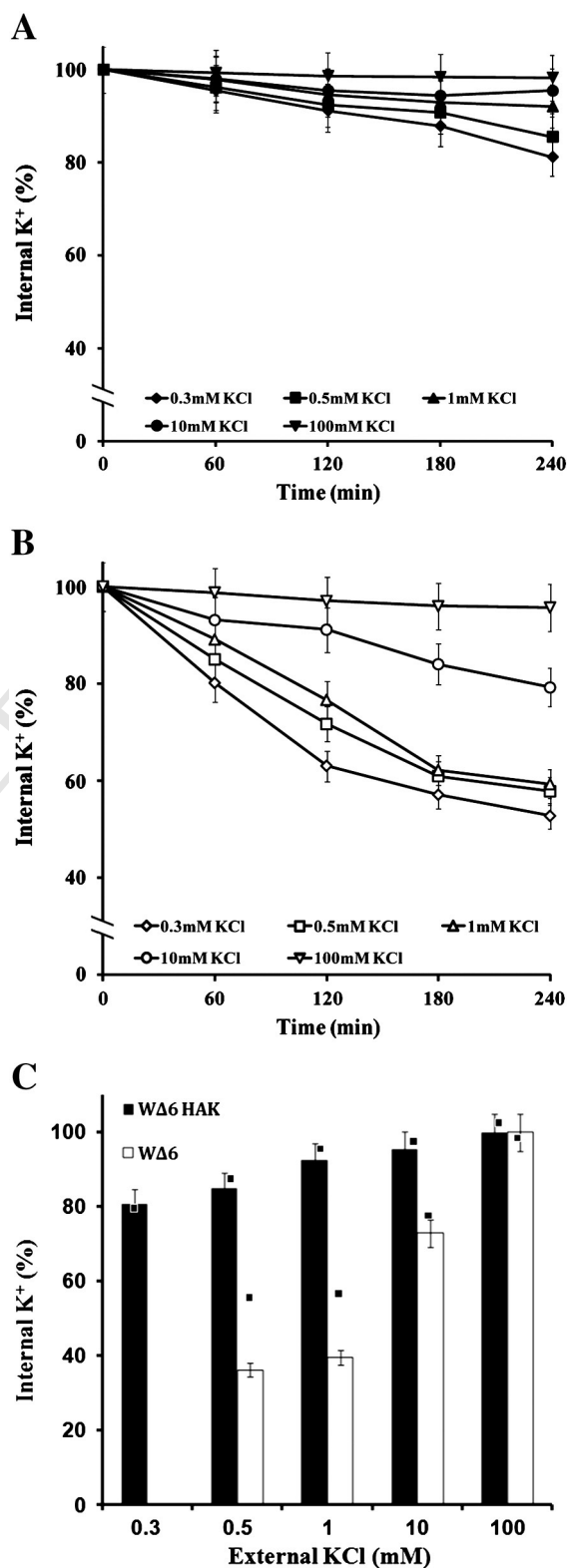
In order to elucidate if the pattern here reported is specific to Trk1 or could be fulfilled by any yeast or fungi  $K^+$  transporter, the *trk1,2* strain expressing the “High Affinity  $K^+$  transporter from *Neurospora crassa* (NcHak1) [22,23] was studied. Results are presented in Fig. 4. *trk1,2* strain expressing NcHAK1 (Fig. 4A) or transformed with the “empty plasmid” (Fig. 4B). Cells were grown without potassium limitation and then resuspended in media containing lower KCl. The strain carrying the *Neurospora* transporter was able to adapt to decreasing external potassium levels in a very efficient mode which fits with the high affinity transport capacity provided by the heterologous system. However, also in this case, for low external potassium, the internal concentration was proportional to the external one (Fig. 4C) and, in that strain, agrees with the stationary states of Fig. 4A. In summary, these results provide additional account on the possibility that TRK1 does not have specific sensor/signaling functions.

### 3.2. Membrane potential, cell volume and sensitivity to cationic drugs

We have previously published that *trk* mutants are hyperpolarized and that, probably as a consequence, an additional phenotype of these mutants is their sensitivity to some cationic drugs. Now, we determined the relative membrane potential, cell volume and the effect of Hygromycin B (Hyg B) and Tetramethylammonium (TMA) on growth in the *trk1,2* mutant carrying different versions of the Trk1 protein (Fig. 5). Relative membrane potential measurements confirmed that, in our genetic background, cells of the double *trk1,2* mutant grown at high potassium (100 mM KCl) show a hyperpolarized state when compared to the wild type. Moreover we found a direct correlation between the capacity to transport potassium and membrane potential. Strains WΔ6 and carrying M1153R were the most hyperpolarized while values measured in strains carrying ScTrk1 or K1147N were lower (Fig. 5A). In all strains, incubation in 0.3 mM KCl triggered a slight hyperpolarization when compared to 100 mM KCl (Fig. 5A). In an additional experiment, cells were grown in 100 mM KCl, washed, transferred to the assay buffer (that does not contain  $K^+$ ), probe was added, relative membrane potential measured and, after 18 min, 100 or 0.3 mM KCl was added. Addition of 0.3 mM KCl did not change significantly the membrane potential, but 100 mM KCl caused depolarization in all cells, the biggest one in WΔ6 with empty vector (Fig. 5B). Under these growth (100 mM KCl) conditions all these strains had comparable cell volume (Fig. 5C). Drop tests in plates containing Hyg B or TMA showed a clear relationship between the capacity to transport potassium and tolerance to both drugs since the WΔ6 strain carrying a wild type Trk1 or the K1147N version of the transporter was similarly tolerant while the strain with the empty plasmid or expressing a Trk1 version very defective in transport capacity (M1153R), was clearly more sensitive to both drugs (Fig. 5D).

## 4. Discussion

In an attempt to understand the coordinated functioning of ion regulation in *S. cerevisiae*, an integrative mathematical model has been recently published [24]. The authors predicted the functioning of several transporters and pathways after stress perturbations but they found inconsistency between experimental data and the model prediction in the case of Trk because the model predicts that, for example, in the presence of  $Na^+$ , increases in Trk activity would increase intracellular  $Na^+/K^+$  ratio which contradicts the known Trk role of discriminating against  $Na^+$  uptake. This fact is explained by the authors on the basis of the over-simplified representation of the Trk system and can illustrate the complexity of potassium homeostasis. In addition, by using a novel inference method we recently showed that the main regulators under conditions of potassium starvation are proton fluxes responding to changes of potassium concentrations and that regulation of the main



**Fig. 4.** Relationship of external and internal potassium in *trk1,2* cells expressing NcHAK1. WΔ6 transformed with pYPGE15 carrying NcHAK1 (A) or with the “empty plasmid” (B) were grown in 100 mM KCl, resuspended in several KCl concentrations and the time course of internal potassium was monitored. (C) Internal potassium concentration in both strains grown overnight at different external potassium concentrations. The steady state concentrations from (A) and (B) are indicated as squares. At 0.3 mM KCl the cells carrying the “empty plasmid” did not grow to allow internal potassium measurements. Experiments were repeated at least three times and the SDs calculated.

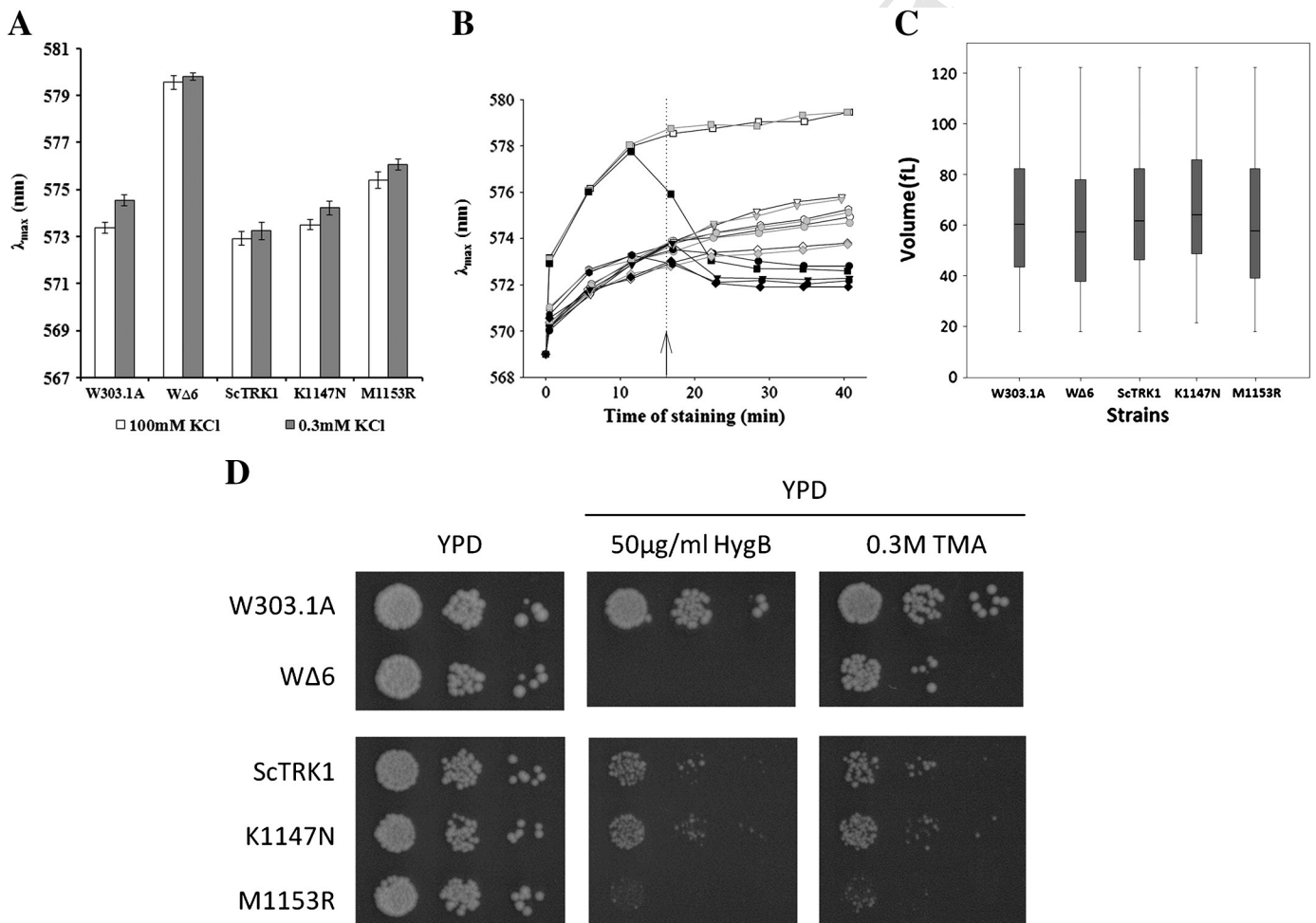


310 potassium transport systems (Trk1,2 and Nha1) in the plasma mem-  
 311 brane is not sufficient to achieve homeostasis [15]. We also reported  
 312 that in wild type cells resuspended in media with different external po-  
 313 tassium concentrations, the potassium efflux and the stationary internal  
 314 concentrations are different for the different external KCl levels [15],  
 315 therefore indicating that this process is not regulated by integral control  
 316 which would mean a perfect adaptation, where the steady state input is  
 317 independent of the steady state output [25].

318 Now we have extended our study to mutants in the main plasma  
 319 membrane transport system. We first confirmed the mentioned results  
 320 working with a different genetic background and found that both wild  
 321 type and *trk1,2* mutants, lost internal potassium when they were  
 322 grown in 100 mM KCl and then transferred to lower external concen-  
 323 trations. However, the dynamics of the potassium loss process seems  
 324 to be clearly different in the two strains. In the wild type, the steady-  
 325 state level reached was proportional to the external KCl amount while  
 326 in the mutant the potassium loss process was not affected by low external  
 327 potassium in a wide range of concentrations probably due to the im-  
 328 paired transport capacity (compare the process at concentrations  
 329 between 0.3 and 1 mM) (Fig. 2A,B). It is relevant that when external

330 potassium was high enough, the mutants were also able to adapt to  
 331 the internal content to the external one. No adaptation to extracellular  
 332 potassium changes would have meant that the mutant cells could not  
 333 cope with a decrease in external potassium and eventually would stop  
 334 growing or die. We conclude now that, similarly to the wild type, the  
 335 *trk1,2* strain shows non-perfect adaptation, that is, the intracellular po-  
 336 tassium concentration depends on the external one, but it is still larger  
 337 than the minimum value required for cell survival.

338 Results from experiments using strains obtained by Haro and  
 339 Rodríguez-Navarro [13] did not indicate the existence of specific  
 340 and well differentiated functions (potassium transport and signaling/  
 341 steady-state regulation) in different regions of the unique M2<sub>D</sub> helix  
 342 of the Trk1 protein. As expected, when a double mutant was  
 343 transformed with a plasmid carrying *TRK1*, it behaved as a wild type.  
 344 Additionally, a mutation in a specific AA residue that very significantly  
 345 affected transport capacity induced the dynamics of intracellular stable  
 346 potassium very similar to the one in the double *trk1,2* mutant. On the  
 347 other hand, when a mutation in the same motif of the protein slightly  
 348 affected transport, the dynamics of potassium loss and stable intracellu-  
 349 lar potassium was again comparable to the one in the wild type (Fig. 3A,



**Fig. 5.** Physiological characterization of wild type (W303.1A), double *trk1,2* mutant (WΔ6), and strains with different versions of Trk1. Comparison of relative plasma membrane potential (A and B), cell volume (C) and effect of cationic drugs on growth (D). Yeast cells were grown in YNB-F medium containing 100 mM KCl, washed, resuspended in fresh YNB-F medium supplemented with 100 mM KCl (white columns) or 0.3 mM KCl (gray columns) and incubated 10 min prior to the transfer to the assay buffer. Staining curves were fitted and the values of  $\lambda_{\max}$  at 30 min of staining were plotted. Determinations were repeated at least three times and the SDs calculated (A). Response of the relative plasma membrane potential to addition of KCl. Cells were grown in YNB-F medium containing 100 mM KCl, washed twice with distilled water, resuspended in the assay buffer and 100 mM KCl (black symbols), 0.3 mM KCl (gray symbols) or no KCl (white symbols) was added to cell suspensions after 17 min of staining (indicated with arrow and dotted line). Staining curves of exponential cells W303.1A[pFL38] (circles), WΔ6[pFL38] (squares), WΔ6[ScTRK1] (diamonds), WΔ6[K1147N] (hexagons) and WΔ6[M1153R] (triangles). A representative assay of three independent experiments is shown (B). Yeast cells were grown in YNB-F synthetic medium (pH 5.8) containing 100 mM KCl to determine cell volume as described in text (C). The effect of Hygromycin B (Hyg B) and Tetramethylammonium (TMA) on growth in the *trk1,2* mutant carrying different versions of Trk1 protein was studied in YPD solid medium containing the indicated amounts of the drugs. Serial 10-fold dilutions were spotted on the plates and cells were incubated at 28 °C for 2 days (D). Cell volume experiments were repeated at least three times, each time  $6 \times 10^4$  cells were analyzed for each strain and each condition. Relative membrane potential determinations were repeated at least three times and the SDs calculated.

B,C and D). These results suggest, that there are no specific and well differentiated transport and signaling/steady-state functions in different regions of the Trk1 protein and that alterations in the signaling/steady-state function are only an indirect consequence of impaired transport capacity. In consequence, although very relevant for internal  $K^+$  adjustment, Trk1 does not have additional specific sensor/signaling functions. This idea was reinforced by the fact that NcHak1 a potassium transporter not belonging to the TRK family also reproduced the pattern here reported although with different quantitative characteristics that are in agreement with the high affinity transport constants reported for this transporter [22,23]. However, we cannot rule out that the regulation of the activity of Hak1 during the adaptation to a new external  $K^+$ -concentration may occur at different levels and may play an additional role [23].

Present results on relative membrane potential measurements and cationic drugs sensitivity, together with results in Kahm et al.'s study [15] fit with the idea that the activity of the Trk system is connected to Pma1. A logical picture to explain the situation would be the following: when grown in high potassium and resuspended in low levels (0.3–0.5 mM), potassium flux is first outward and then, after some time, there is a reuptake. As mentioned above, the initial rate of change of internal  $K^+$  (between 0 and 60 min) was higher for wild type than for strains lacking the Trk system at 0.3 and 0.5 mM (Fig. 2A,B). This behavior seems to be consistent with the claim that enhanced hyperpolarization helps the cells to retain  $K^+$ . Once  $K^+$  reuptake becomes an important component, the rate of decline of internal  $K^+$  becomes lower for wild type than for the mutant because this reuptake is not so effective in *trk1,2* mutants. In Kahm et al.'s study [15], it was shown for the wild type and for the *trk1,2* double mutant, that the Pma1 ATPase increases its activity after resuspension. For the wild type, it was also shown, that the gene expression of carbonic anhydrase increases. It is likely that these increased proton fluxes will hyperpolarize the membrane. As an immediate consequence, the increased  $V_m$  limits the loss of potassium and moreover the increased  $V_m$  generates the thermodynamic force for a reuptake of potassium via Trk1,2. If this is absent or nonfunctional, the Pma1-effect is still there, but the free energy stored in the membrane potential cannot be used for the reuptake, resulting in a hyperpolarized membrane state and higher sensitivity to cationic drugs.

Currently, the exact mechanism for the increased proton fluxes underlying hyperpolarization is unknown, but it has been shown that Pma1 can be regulated by kinase-mediated phosphorylation [26] and the gene NCE103 coding for carbonic anhydrase is transcriptionally regulated [27].

In short, we propose that phenotypes associated to mutants lacking the Trk potassium transport system such as hyperpolarization, sensitivity to cationic drugs or alterations in the signaling/steady-state function are directly linked to the transport capacity of the cell and can be explained as just a consequence of the defective potassium transport process.

Supplementary data to this article can be found online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamem.2013.08.022>.

## Acknowledgements

This work is a part of TRANSLUCENT-2, a SysMo ERA-NET funded research project and was supported by the Ministry of Science and Innovation, Spain, grant number EUI 2009-04153 to J.R. and the Ministry of Education and Research (BMBF) grant 0315786C to M.K. R.H. is a recipient of a Panama Government fellowship (SENACYT-IFARHU).

The work in H.S. laboratory was supported by GA AS CR (IAA500110801), Institutional Concept (RVO: 67985823) and the project The Center of Biomedical Research (CZ.1.07/2.3.00/30.0025).

This project is co-funded by the European Social Fund and the state budget of the Czech Republic.

We thank A. Rodríguez-Navarro and R. Haro from the Centro de Biotecnología y Genómica de Plantas (Madrid, Spain) for kindly supplying the strains and plasmids, and for helpful discussions.

## References

- [1] J. Ariño, J. Ramos, H. Sychrová, Alkali metal cation transport and homeostasis in yeasts, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 74 (2010) 95–120.
- [2] A. Rodríguez-Navarro, J. Ramos, Dual system for potassium transport in *Saccharomyces cerevisiae*, *J. Bacteriol.* 159 (1984) 940–945.
- [3] J. Ramos, P. Contreras, A. Rodríguez-Navarro, A potassium transport mutant of *Saccharomyces cerevisiae*, *Arch. Microbiol.* 143 (1985) 88–93.
- [4] R.F. Gaber, C.A. Styles, G.R. Fink, TRK1 encodes a plasma membrane protein required for high-affinity potassium transport in *Saccharomyces cerevisiae*, *Mol. Cell. Biol.* 8 (1988) 2848–2859.
- [5] C.H. Ko, R.F. Gaber, TRK1 and TRK2 encode structurally related  $K^+$  transporters in *Saccharomyces cerevisiae*, *Mol. Cell. Biol.* 11 (1991) 4266–4273.
- [6] J. Ramos, R. Alijo, R. Haro, A. Rodríguez-Navarro, TRK2 is not a low-affinity potassium transporter in *Saccharomyces cerevisiae*, *J. Bacteriol.* 176 (1994) 249–252.
- [7] D.B. Lauff, G.E. Santa-María, Potassium deprivation is sufficient to induce a cell death in *Saccharomyces cerevisiae*, *FEMS Yeast Res.* 19 (2010) 497–507.
- [8] R. Madrid, M.J. Gómez, J. Ramos, A. Rodríguez-Navarro, Ectopic potassium uptake in *trk1 trk2* mutants of *Saccharomyces cerevisiae* correlates with a highly hyperpolarized membrane potential, *J. Biol. Chem.* 273 (1998) 14838–14844.
- [9] J.M. Mulet, M.P. Leube, S.J. Kron, G. Rios, G.R. Fink, R. Serrano, A novel mechanism of ion homeostasis and salt tolerance in yeast: the Hal4 and Hal5 protein kinases modulate Trk1-Trk2 potassium transporter, *Mol. Cell. Biol.* 19 (1999) 3328–3337.
- [10] S.R. Durell, Y. Hao, T. Nakamura, E.P. Bakker, H.R. Gay, Evolutionary relationship between  $K^+$  channels and symporters, *Biophys. J.* 77 (1999) 775–788.
- [11] S.R. Durell, H.R. Guy, Structural models of the KtrB, and Trk1,2 symporters based on the structure of the KcsA  $K^+$  channel, *Biophys. J.* 77 (1999) 789–807.
- [12] R. Haro, A. Rodríguez-Navarro, Molecular analysis of the mechanism of potassium uptake through the TRK1 transporter of *Saccharomyces cerevisiae*, *Biochim. Biophys. Acta* 1564 (2002) 114–122.
- [13] R. Haro, A. Rodríguez-Navarro, Functional analysis of the MD(2) helix of the TRK1 potassium transporter of *Saccharomyces cerevisiae*, *Biochim. Biophys. Acta* 1613 (2003) 1–6.
- [14] J.M. Thevelein, K. Voordeckers, Functioning and evolutionary significance of nutrient transporters, *Mol. Biol. Evol.* 26 (2009) 2407–2414.
- [15] M. Kahm, C. Navarrete, V. Llopis-Torregrosa, R. Herrera, L. Barreto, L. Yenush, J. Ariño, J. Ramos, M. Kschischo, Potassium starvation in yeast: mechanisms of homeostasis regulated by mathematical modeling, *PLoS Comput. Biol.* 8 (2012) 1–11.
- [16] J.P. Brunelli, M.L. Pall, A series of yeast/*Escherichia coli* lambda expression vectors designed for directional cloning of cDNAs and cre/lox-mediated plasmid excision, *Yeast* 12 (1993) 1309–1318.
- [17] C. Navarrete, S. Petrežselyova, L. Barreto, J.L. Martínez, J. Zahrádka, J. Ariño, H. Sychrová, J. Ramos, Lack of main  $K^+$  in *Saccharomyces cerevisiae* cells affects yeast performance in both potassium-sufficient and potassium-limiting conditions, *FEMS Yeast Res.* 10 (2010) 508–517.
- [18] J. Ramos, R. Haro, A. Rodríguez-Navarro, Regulation of potassium fluxes in *Saccharomyces cerevisiae*, *Biochim. Biophys. Acta* 1029 (1990) 211–217.
- [19] L. Marešová, E. Urbánková, D. Gášková, H. Sychrová, Measurement of plasma membrane potential changes in *Saccharomyces cerevisiae* cells reveal the importance of the Tok1 channel in membrane potential maintenance, *FEMS Yeast Res.* 6 (2006) 1039–1046.
- [20] S. Petrežselyova, J. Zahrádka, H. Sychrová, *Saccharomyces cerevisiae* BY4741 and W303-1A laboratory strains differ in salt tolerance, *Fungal Biol.* 114 (2010) 144–150.
- [21] D. Gášková, B. Brodská, P. Heřman, J. Večeř, J. Malinský, K. Sigler, O. Benada, J. Plášek, Fluorescent probing of membrane potential in walled cells: diS-C<sub>3</sub>(3) assay in *Saccharomyces cerevisiae*, *Yeast* 14 (1998) 1189–1197.
- [22] R. Haro, L. Sainz, F. Rubio, A. Rodríguez-Navarro, Cloning of two genes encoding potassium transporters in *Neurospora crassa* and expression of the corresponding cDNAs in *Saccharomyces cerevisiae*, *Mol. Microbiol.* 31 (1999) 511–520.
- [23] A. Rivetta, K.E. Allen, C.W. Slayman, C.L. Slayman, Coordination of  $K^+$  transporters in *Neurospora*: TRK1 is scarce and constitutive, while HAK1 is abundant and highly regulated, *Eukaryot Cell* 12 (2013) 684–696.
- [24] R. Ke, P.J. Ingram, K. Haynes, An integrative model of ion regulation in yeast, *PLoS Comput. Biol.* 9 (2013) 1–14.
- [25] T.M. Yi, Y. Huang, M.I. Simon, J. Doyle, Robust perfect adaptation in bacterial chemotaxis through integral feedback control, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 97 (2000) 4649–4653.
- [26] S. Lecchi, C.J. Nelson, K.E. Allen, D.L. Swaney, K.L. Thompson, J.J. Coon, M.R. Sussman, C.W. Slayman, Tandem phosphorylation of Ser-911 and Thr-912 at the C terminus of yeast plasma membrane  $H^+$ -ATPase leads to glucose-dependent activation, *J. Biol. Chem.* 282 (2007) 35471–35481.
- [27] G. Amoroso, L. Morell-Avrahov, D. Müller, K. Klug, D. Sültemeyer, The gene NCE103 (YNL036w) from *Saccharomyces cerevisiae* encodes a functional carbonic anhydrase and its transcription is regulated by the concentration of inorganic carbon in the medium, *Mol. Microbiol.* 56 (2005) 549–558.

# Potassium Starvation in Yeast: Mechanisms of Homeostasis Revealed by Mathematical Modeling

Matthias Kahm<sup>1</sup>, Clara Navarrete<sup>2</sup>, Vicent Llopis-Torregrosa<sup>3</sup>, Rito Herrera<sup>2</sup>, Lina Barreto<sup>4</sup>, Lynne Yenush<sup>3</sup>, Joaquin Ariño<sup>4</sup>, Jose Ramos<sup>2</sup>, Maik Kschischo<sup>1\*</sup>

**1** Department of Mathematics and Technology, RheinAhrCampus, University of Applied Sciences, Koblenz, Remagen, Germany, **2** Department of Microbiology, Campus de Rabanales, University of Córdoba, Córdoba, Spain, **3** Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas UPV-CSIC, Ciudad Politécnica de la Innovación, Universidad Politécnica de Valencia, Valencia, Spain, **4** Institut de Biotecnologia i Biomedicina & Department of Biochemistry and Molecular Biology, Universitat Autònoma de Barcelona, Cerdanyola del Vallès, Barcelona, Spain

## Abstract

The intrinsic ability of cells to adapt to a wide range of environmental conditions is a fundamental process required for survival. Potassium is the most abundant cation in living cells and is required for essential cellular processes, including the regulation of cell volume, pH and protein synthesis. Yeast cells can grow from low micromolar to molar potassium concentrations and utilize sophisticated control mechanisms to keep the internal potassium concentration in a viable range. We developed a mathematical model for *Saccharomyces cerevisiae* to explore the complex interplay between biophysical forces and molecular regulation facilitating potassium homeostasis. By using a novel inference method (“the reverse tracking algorithm”) we predicted and then verified experimentally that the main regulators under conditions of potassium starvation are proton fluxes responding to changes of potassium concentrations. In contrast to the prevailing view, we show that regulation of the main potassium transport systems (Trk1,2 and Nha1) in the plasma membrane is not sufficient to achieve homeostasis.

**Citation:** Kahm M, Navarrete C, Llopis-Torregrosa V, Herrera R, Barreto L, et al. (2012) Potassium Starvation in Yeast: Mechanisms of Homeostasis Revealed by Mathematical Modeling. *PLoS Comput Biol* 8(6): e1002548. doi:10.1371/journal.pcbi.1002548

**Editor:** Arne Elofsson, Stockholm University, Sweden

**Received:** December 5, 2011; **Accepted:** April 23, 2012; **Published:** June 21, 2012

**Copyright:** © 2012 Kahm et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Funding:** Maik Kschischo and Matthias Kahm were supported by BMBF grant 0315786C (SysMo2/Translucent 2). Work in Joaquin Ariño laboratory was supported by grants BFU2008-04188-C03-01, BFU2011-30197-C3-01, GEN2006-27748-C2-1-E/SYS (SysMo/Translucent) and EUI2009-04147 (SysMo2/Translucent 2), from the MICINN, Spain. Joaquin Ariño was the recipient of an Ajut 2009SGR-1091 and an ICREA Academia Award (Generalitat de Catalunya). Work in José Ramos laboratory was supported by grants GEN2006-27748-C2-2-E/SYS (SysMo/Translucent), BFU2008-04188-C03-03 and EUI2009-04153 (SysMo2/Translucent 2), (MICINN, Spain). Work in Lynne Yenush laboratory was supported by grants BFU2008-04188-C03-02, BFU2011-30197-C03-03 (MICINN, Spain) and ACOMP/2011/024 (Generalitat Valenciana). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

**Competing Interests:** The authors have declared that no competing interests exist.

\* E-mail: kschischo@rheinahrcampus.de

## Introduction

Potassium is an essential cation required for many cellular processes including the regulation of cell volume, intracellular pH, protein synthesis, activation of enzymes, and maintenance of the plasma membrane potential [1–4]. In their natural environment, most cell types have to accumulate intracellular potassium against a strong concentration gradient. Animal cells utilize the energy stored in ATP to directly pump potassium ions into the cell via the Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase. This enzyme is absent in most fungi and plants [2], which have developed alternative mechanisms to control the intracellular potassium concentration. *Saccharomyces cerevisiae* (*S.c.*) cells can grow in media with a potassium concentration ranging from 10 μM to 2.5M. Despite extensive knowledge about the identity and function of most potassium transporters in this organism [3], a systems level understanding of the interplay and regulation of the various transport pathways is still lacking.

In *S.c.*, uptake of potassium across the plasma membrane is driven by the membrane potential, which itself is generated by proton pumping via the H<sup>+</sup>-ATPase, Pma1 [5,6]. The high affinity and high velocity transporter, Trk1, is the major uptake system for potassium. The expression levels of the other Trk protein, Trk2, are low, compared to Trk1, and therefore

considered of minor importance [7,8]. A low affinity uptake observed by electrophysiological techniques in *trk1,2* double mutants has been attributed to the putative calcium blocked channel Nsc1, though the gene responsible for this transport activity has not been found yet [9,10]. Efflux of potassium is strongly pH-dependent and coupled to sodium toxicity. The antiporter Nha1 extrudes Na<sup>+</sup> or K<sup>+</sup> ions in exchange for protons under acidic environmental conditions and contributes to the continuous cyclic flux of potassium ions across the plasma membrane and to pH regulation [11,12]. It is only at higher external pH that potassium or sodium is actively extruded by the Ena1 ATPase [13–15]. Another potassium efflux system is the voltage gated channel, Tok1. Electrophysiological studies revealed that Tok1 opens at positive membrane potentials, which do not occur under normal physiological conditions [16]. Potassium is also stored in intracellular compartments, in particular in the vacuole. The effect of intracellular transport is, however, not sufficiently characterized yet [3,17].

Besides protons, a number of other ions are associated with the transport of potassium. The anion bicarbonate was shown to be important for potassium accumulation [18]. Decarboxylation reactions produce carbon dioxide, which is quickly converted to carbonic acid (H<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>), by carbonic anhydrase. Carbonic acid can



## Author Summary

Without potassium, all living cells will die; it has to be present in sufficient amounts for the proper function of most cell types. Disturbances in potassium levels in animal cells result in potentially fatal conditions and it is also an essential nutrient for plants and fungi. Cells have developed effective mechanisms for surviving under adverse environmental conditions of low external potassium. The question is how. Using the eukaryotic model organism, baker's yeast (*Saccharomyces cerevisiae*), we modeled how potassium homeostasis takes place. This is because, through mathematical modeling and experimentation, we found that the electro-chemical forces regulating potassium concentrations are coupled to proton fluxes, which respond to external conditions in order to maintain a viable potassium level within the cells. Our results challenge the current understanding of potassium homeostasis in baker's yeast, and could potentially be extended to other microorganisms, including non-conventional yeasts such as the pathogenic *Candida albicans*, and plant cells. In the future, the fundamental bases for this descriptive and predictive model might contribute to the development of new treatments for fungal infections, or developments in crop sciences.

either diffuse freely across the cell membrane or dissociate into bicarbonate ( $\text{HCO}_3^-$ ), and protons. While protons can be extruded via Pma1, the permeability of bicarbonate is very low compared to that of carbonic acid. The resulting accumulation of bicarbonate provides the link to potassium homeostasis; the negative charges carried by bicarbonate can be balanced by potassium cations. In principle, other weak acids could contribute in a similar way to potassium accumulation, but our results below and previous investigations suggest that the bicarbonate reaction plays an important role [18]. Potassium transport is also related to ammonium toxicity [19]. Under low external potassium conditions, ammonium leaks into the cells, presumably via potassium transporters. Toxic concentrations of ammonium are counteracted by increased production and excretion of amino acids [19].

The maintenance of a minimal potassium concentration requires the orchestration of the different transport systems under the constraints of various thermodynamic forces. In this article, we use a mathematical model in conjunction with a novel inference algorithm (the reverse tracking algorithm) and model-driven experimentation to identify the key transport mechanisms that must be regulated under the conditions of potassium shortage. We show that the activation of the proton pump, Pma1, and the activation of the bicarbonate reaction sequence are the regulators of potassium homeostasis. We also show that potassium homeostasis is an example of non-perfect adaptation: The intracellular potassium concentration depends on the external potassium concentration and is only regulated to keep minimal levels of potassium required for survival. This is different from other homeostatic systems such as osmoregulation [20], where certain stationary systems characteristics perfectly adapt, irrespective of the external conditions.

## Results

### Potassium starvation experiments

To study the response of *S.c.* cells to an abrupt decrease of external potassium, we performed potassium starvation experiments using  $\text{K}^+$  and  $\text{Na}^+$  free media. Cells grown in non-limiting

potassium (50mM KCl) were washed with  $\text{K}^+$ -free YNB medium (YNB without amino acids and ammonium sulphate, Formedium UK, CYN7505 plus 2% glucose, traces of KCl left: 15  $\mu\text{M}$ , hereafter referred to as Translucent  $\text{K}^+$ -free medium [21]) and resuspended in the same medium [12]. The time course for changes in intracellular potassium concentrations for the wild type strain exhibits two different phases (Figure 1A). In the first hour of starvation there is a large net efflux of potassium indicated by the rapid decrease in the intracellular concentration. Loss of potassium slows down in the second phase and the internal concentration slowly approaches a new stationary state (Table 1). Although the cells cannot perfectly adapt to the large concentration gradients they are able to keep a certain amount of potassium required for survival (approx. 30mM). Interestingly, the second phase of potassium loss is slower for the *trk1,2* double mutant than for the wild type (wt). This is surprising, because it is believed [3] that increased uptake of potassium via Trk1 even at very low external potassium concentrations is a major mechanism of potassium homeostasis. Thus, one would have expected the concentration of internal potassium in the *trk1,2* mutant to be lower than in the wild type. The time course for the *nha1* mutant is not significantly different from the *trk1,2* mutant (see also Figure S7 in Text S1).

### A mathematical model for potassium transport

Multiple signaling pathways modulate the activity of the various transport systems involved in potassium homeostasis [2–6,14,15,22–24]. However, it is not entirely clear which of these signals are essential to achieve homeostasis and how they are acting under the constraints set by the thermodynamics of ion transport. To study these constraints, we developed a minimalistic mathematical model which incorporates the essential parts known to be important for potassium homeostasis. The model describes the dynamic coupling between the intracellular potassium concentration  $[\text{K}^+]_i$ , internal pH ( $p\text{H}_i$ ), carbon dioxide concentration  $[\text{CO}_2]$ , membrane voltage  $V_m$ , and cell volume  $V$ . A complete description of the equations and parameter values is given in the Materials and Methods section and derivations can be found in the Text S1. Here, only the basic model structure is given:

$$\frac{d}{dt}[\text{K}^+]_i = - \left( J_K^{\text{Trk1,2}} + J_K^{\text{Nha1}} + J_K^{\text{Tok1}} + J_K^{\text{leak}} \right) \quad (1)$$

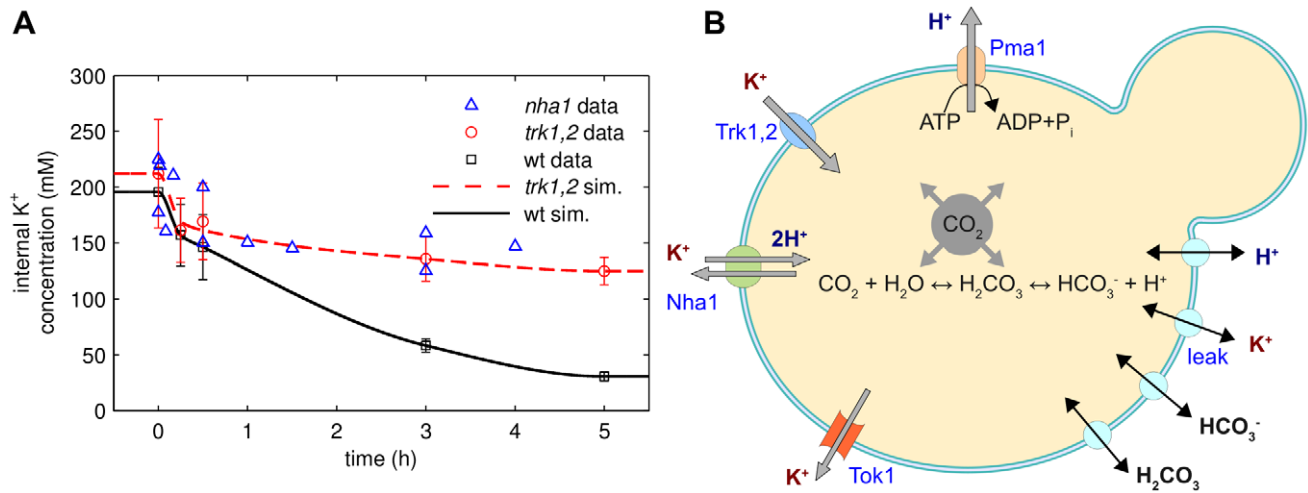
$$\frac{d}{dt}[\text{CO}_2] = - \left( J_{\text{H}_2\text{CO}_3}^{\text{transport}} + J_{\text{HCO}_3^-}^{\text{transport}} + J_{\text{CO}_2}^{\text{prod}} \right) \quad (2)$$

$$\frac{d}{dt}[p\text{H}_i] = \frac{1}{\beta} \left( J_H^{\text{Pma1}} + J_H^{\text{Nha1}} + J_H^{\text{leak}} + (1-\alpha)J_{\text{H}_2\text{CO}_3}^{\text{transport}} + \alpha J_{\text{HCO}_3^-}^{\text{transport}} \right) \quad (3)$$

$$V_m = - \frac{F \cdot V}{c_m \cdot A} \left( \beta \cdot p\text{H}_i - [\text{K}^+]_i + [\text{HCO}_3^-]_i - [\text{Z}] \right) \quad (4)$$

$$\frac{d}{dt}[V] = L_p \cdot A \cdot (\Pi_i - \Pi_0 - \Pi_t) \quad (5)$$

Equation (1) links the temporal change of the intracellular potassium concentration to the various potassium transport fluxes



**Figure 1. Homeostatic response to potassium starvation.** (A) Experimental time courses of internal potassium concentrations in wild-type (WT) cells, *trk1,2* double mutants and *nha1* mutants (symbols). Cells were grown in 50 mM KCl and resuspended in Translucent K<sup>+</sup>-free medium at t=0. Solid lines (“sim”) are fits to the model using the reverse tracking approach (see text). (B) The components of the minimal biophysical model. doi:10.1371/journal.pcbi.1002548.g001

$J_K$  (Figure 1B). The model comprises the Trk1,2 system (abstracted as a single system,  $J_K^{Trk1,2}$ ), the Nha1 antiporter ( $J_K^{Nha1}$ ), and the Tok1 channel ( $J_K^{Tok1}$ ). To mimic the joint contribution of other, mainly non-specific transport pathways for potassium (e.g. Nsc1) we added a potassium leak current  $J_K^{leak}$  to the model. The Ena1 ATPase is neglected because it is known to be inactive at the relatively low external pH used in the experiments [15].

The dynamics of carbon dioxide (Equation (2)) is coupled to the transport fluxes of bicarbonate  $J_{HCO_3^-}^{transport}$  and carbonic acid  $J_{H_2CO_3}^{transport}$ . These transport rates are given in the Materials and Methods section (Equations (18–19)) and a detailed derivation of the bicarbonate model [25] is given in the Text S1. Carbon dioxide is produced in various metabolic processes such as the TCA cycle or pyruvate decarboxylation. It is impossible to model all these processes explicitly, but we incorporate them in the effective metabolic carbon dioxide production flux  $J_{CO_2}^{prod}$ . This flux is an input to the model and was initially assumed to be constant.

The change in pH (Equation (3)) per change in proton concentration is described by the buffering capacity  $\beta$ . In principle,  $\beta$  is a function of the internal pH, but due to the combined action of various buffering species [26] it can be approximated by a constant for a wide range of intracellular pH values. In addition to the proton fluxes via the H<sup>+</sup>-ATPase Pma1 ( $J_H^{Pma1}$ ) and the Nha1 antiporter ( $J_H^{Nha1}$ ) there are many other proton transport pathways in yeast. The corresponding net flux is

subsumed in the proton leak current  $J_H^{leak}$ . The effective proton flux originating from the bicarbonate reaction sequence is given by the term  $(1 - \alpha)J_{H_2CO_3}^{transport} + \alpha J_{HCO_3^-}^{transport}$ , where  $\alpha$  is the pH-dependent fraction of dissociated carbon dioxide.

The membrane potential (Equation (4)) is modeled as a charge balance equation ( $c_m$ , specific membrane capacitance;  $F$ , Faraday constant;  $A$ , surface area of the cell) [27]. We explicitly modeled the charges carried by potassium, total protons ( $\beta \cdot pH_i$ ) and bicarbonate. The remaining net charges contributing to the membrane potential are subsumed in  $[Z]$ , which is determined by the initial conditions of the dynamic variables in the model.

The cell volume (Equation (5)) depends on the balance between internal osmotic pressure  $\Pi_i$ , external osmotic pressure  $\Pi_o$  and turgor pressure  $\Pi_t$  [28]. Ion transport processes change the intra- and extracellular solute concentrations and thus have an osmotic effect (Equations (24–26)) in Materials and Methods. The resistance against volume changes is given by the hydraulic permeability parameter  $L_p$  [29].

The concentration and voltage dependent kinetics of all transport systems were described by simple thermodynamic consistent relationships. The driving force for the transport fluxes of ions across the plasma membrane can be written as the difference  $V_m - E$  of the membrane potential and the equilibrium potential  $E$ . The equilibrium potential depends on the concentrations and stoichiometry of the ions transported, see Equations (12–14) in the Materials and Methods section. For the potassium fluxes in Equation (1) and the proton leak in Equation (3) we assumed linear relations (Ohm’s law) of the form  $J \propto I = g(V_m - E)$  between the driving force and the transport flux  $J$ , or the corresponding electrical current  $I$ , respectively. For the leak currents  $I_K^{leak}$  and  $I_H^{leak}$  we initially assumed constant conductivity parameters  $g$  (Equations (9) and (11) in Materials and Methods). The conductivity of the transport proteins Trk1,2, Nha1 and Tok1 was modeled as a function of the membrane voltage, see Equations (6–8) in Materials and Methods.

This minimalistic model captures the essential biophysical and thermodynamic constraints under which control of potassium homeostasis operates. Despite the simplicity of the model, the experimental data was not sufficient to uniquely identify all the parameters. We decided to use this flexibility to explore the

**Table 1. Optical densities during starvation.**

Strain	Time of starvation (hours)				
	1	2	3	4	5
wt	0.3	0.39	0.45	0.5	0.5
trk1,2	0.3	0.35	0.4	0.42	0.43

Optical densities for the wild type and the *trk1,2* double mutant corresponding to the potassium starvation experiments of Figure 1A.

doi:10.1371/journal.pcbi.1002548.t001

parameter space for regions that are consistent with the data and performed extensive parameter scans and sensitivity analysis simulations. However, we were unable to identify a single parameter combination which reproduced the experimental time courses for the wild type strain observed in Figure 1A. In the model, all potassium inside the cell was rapidly and completely lost upon starvation (Figure S4A in Text S1). Based on our model simulations, this believed to be caused by a strong efflux via the Nha1 antiporter driven by the large concentration gradient across the plasma membrane. This model behavior is robust against various model variations, including the incorporation of an intracellular potassium storage mechanism that mimics the contribution of intracellular compartments to potassium retention. Thus, we conclude that further dynamic mechanisms counteracting the strong potassium gradient are essential for homeostasis. Importantly, the model described so far incorporates only the biophysics of transport but does not account for gene regulatory, signal transduction or metabolic events affecting the transporter activity.

### Predicting the regulators with the reverse tracking algorithm

The fact that the minimal model is not able to reproduce the experimental time courses for potassium starvation means that there are some unmodeled dynamics that are not captured by the model. Under the working hypothesis that the model covers the major biophysical effects of potassium transport we assumed that there are additional regulatory responses to a shortage of potassium. Available knowledge [2,3] and data is currently not sufficient to develop exhaustive models for the metabolic, signal transduction and gene regulatory responses to potassium starvation. It is not even clear which of the transporters or other components are activated or deactivated for the maintenance of homeostasis. In engineering terms [30], neither the regulators nor the signals triggering their action are sufficiently characterized.

To overcome this limitation, we combined our minimal biophysical model with an inference algorithm for unmodeled dynamics. We assumed that the unknown regulatory events modulate the activity of the transport systems or other components in the model. Mathematically this means that a constant parameter in the model might in fact not be constant, but a function of time. For example, the maximum conductivity  $g_{Trk1,2}$  (see Equation 6) of the Trk1,2 transport system could be influenced by signal transduction events [3,31] in response to low potassium. Any attempt to explicitly model this regulation by additional equations is hindered by insufficient knowledge of the structure and dynamics of the regulatory networks involved. However, one might recoin the question and ask: “Is there a function  $g_{Trk1,2}(t)$  such that the given experimental time course  $[K^+]_i^{exp}(t)$  of intracellular potassium and the time course  $[K^+]_i(t)$  predicted by the model are in sufficient agreement?”. If such a function  $g_{Trk1,2}(t)$  would exist we would regard the modulation of the Trk1,2 transporter as one potential regulatory mechanism and Trk1,2 as a *potential* regulator of potassium homeostasis. However, there might be another parameter  $\theta$  (e.g.  $g_{Nha1}, g_{Tok1}, J_{Pma1}^{max}, \dots$ ) associated with a transporter or another component in the model for which a time course  $\theta(t)$  exists such that experimental data can be reproduced. Our strategy was now to test different parameters and corresponding processes for being potential regulators, see Figure 2A. We define a transporter or any other component in the model to be a potential regulator if a tracking control signal  $\theta(t)$  exists which changes the activity of the component in such a way that the experimental time course and stationary data can be reproduced. We refer to this inference approach as the reverse

tracking algorithm, a more detailed mathematical explanation is given in Materials and Methods.

We used the reverse tracking algorithm to test the transporters Trk1,2, Ena1, Nha1, Tok1 and Pma1 and the activity of the bicarbonate reaction for being potential regulators of potassium homeostasis and then compared the predicted tracking control signals to experimental observations. There is no tracking control signal for the major uptake system Trk1,2; see Figure S1 in the Text S1. This is in contrast to the prevailing view that increased uptake of potassium via Trk1 is essential for potassium homeostasis under starvation conditions. The loss of potassium after starvation is slower in *trk1,2* double mutants (see Figure 1A) than in wild type cells. It was experimentally observed [12] that these double mutants have a more negative membrane potential than wild type cells under starvation conditions and also when external potassium is plentiful. This stronger membrane potential (see also Figure S3 in the Text S1) counteracts the outwardly directed potassium concentration gradient and thus explains the higher potassium levels after starvation. Taken together, these results show that the uptake of potassium via Trk1,2 is not the primary mechanism to prevent excessive loss of potassium under starvation conditions.

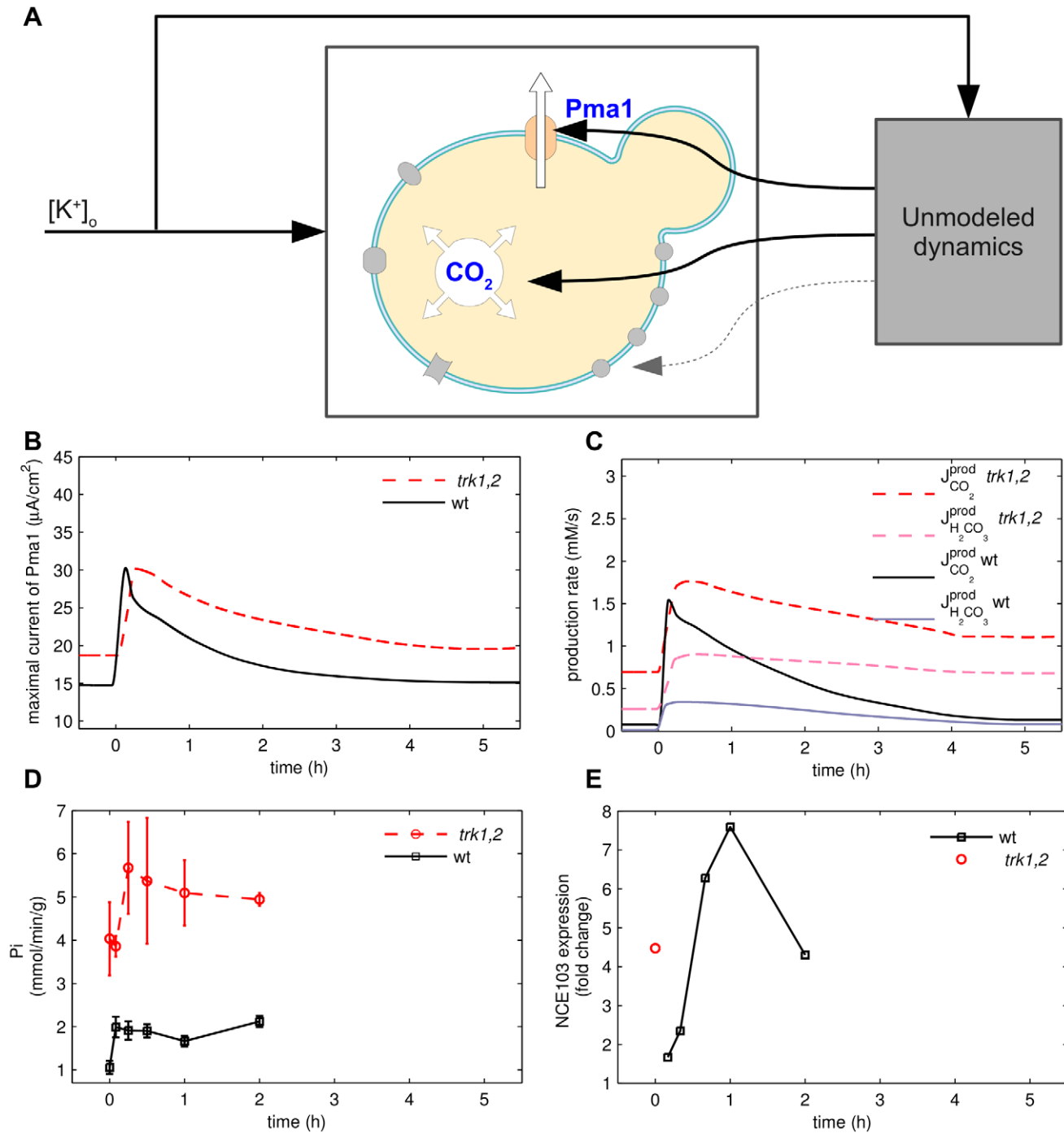
Although we found a tracking control signal for the Nha1 antiporter, we excluded it from our list of potential regulators based on two observations. First, as indicated in Figure 1A, the time course of potassium loss in *nha1* mutants is slower than in the wild type and similar to the *trk1,2* mutants. Secondly, it was demonstrated that the influence of Nha1 on the internal potassium concentrations decreases with time [11]. This is in contradiction to our predicted tracking signal (Figure S2 in Text S1), which is nonmonotonic in time.

Similarly, the unspecific transport pathways (leak currents) were excluded, because it is not plausible that unspecific transporters are regulated for the specific purpose of potassium homeostasis. This is based on the well founded assumption that all potassium specific transporters are active under our experimental conditions are known [3] and included in the model. The non-specific cation uptake system NSC1 can be excluded, because our medium contains enough calcium to render NSC1 inactive [32]. The proton flux  $J_H^{leak}$  includes many co-transport mechanisms with nutrients and other molecules. It is thus unlikely, that one of these transport mechanisms is specifically regulated in response to potassium starvation.

The remaining parts in our model are the Pma1 H<sup>+</sup>-ATPase and the bicarbonate reaction sequence. For both of them, the reverse tracking approach predicts a rapid burst of activity in response to the rapid removal of external potassium (Figure 2B and 2C). Activation of proton pumping by Pma1 (Figure 2B) hyperpolarizes the plasma membrane, which counteracts the large concentration gradient of potassium and thus limits potassium efflux. An increased reaction flux (see Figure 2C) through the bicarbonate system has a similar effect: The negative charges carried by bicarbonate increase the magnitude of the membrane potential and thereby compensate the potassium gradient.

### Experimental validation of the predicted regulators

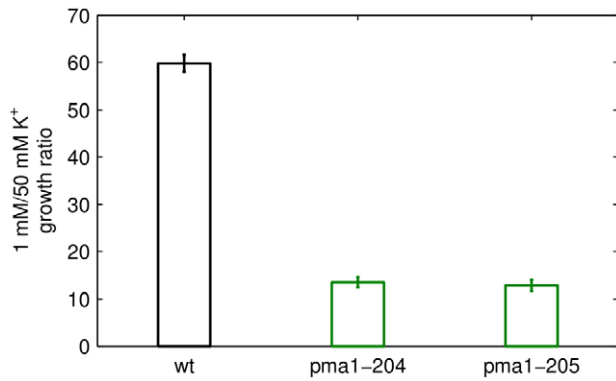
To test the prediction that Pma1 is activated after potassium starvation, we measured Pma1 activity from crude membrane preparations [33] using an in vitro method that has been extensively established as a faithful measure of in vivo Pma1 function [6,33,34]. Indeed, the activity measurements confirm the prediction of the reverse tracking algorithm that Pma1 activity increases rapidly (timescale of 10 minutes) and slowly declines during the first hours of potassium starvation (Figure 2D). Control



**Figure 2. Regulation of potassium starvation.** (A) The tracking approach to detect potential regulators of homeostasis. Parameters which are constant in the minimal model are now considered as input functions. A parameter is called a potential regulator if it can be chosen to recover (“track”) the experimental time courses. (B,C) The predicted activity changes for Pma1 (B) and the bicarbonate reaction system (C) in response to potassium starvation. (D) Time course of ATPase activity for Pma1. (E) Time course of gene expression for the *NCE103* gene encoding carbonic anhydrase in the wild type strain. Confirmatory qRT-PCR measurements yield a  $4.31 \pm 0.58$  fold increase of the mRNA level in the wild type after 60 minutes of potassium starvation. For comparison, the expression in non-starved *trk1,2* double mutant with respect to the wild type strain is depicted. The mRNA levels for *NCE103* in *trk1,2* double mutants growing at  $50\text{mM K}^+$  are higher by a factor of  $4.1 \pm 0.82$  compared to the wild type strain (qRT-PCR measurements). doi:10.1371/journal.pcbi.1002548.g002

experiments revealed that Pma1 protein levels do not change under these conditions. Moreover, we also observe, as predicted by the model, that the Pma1 activity is higher in the *trk1,2* mutant than in the wild type strain throughout the time course of

potassium starvation (Figures 2B and D). To further substantiate that the activation of Pma1 is essential for the response to low potassium, we measured growth for Pma1 mutants *pma1-204* and *pma1-205* [35] with decreased expression and ATPase activity (33



**Figure 3. PMA1 mutants with decreased expression and ATPase activity.** Strains RS514 (wild type, WT), RS515 (*pma1-204*) and RS516 (*pma1-205*) were grown in YNB-based medium (supplemented with adenine and histidine) with 2% galactose to maintain Pma1 activity from plasmid pYCp50-GALp::PMA1. Cells were diluted to an OD<sub>600</sub> of 0.04 in Translucent K<sup>+</sup>-free medium (plus with 2% glucose) containing 1 mM or 50 mM KCl. Growth was monitored for 17 h. Data represent the growth ratio at 1 and 50 mM KCl and are mean  $\pm$  SEM from 3 determinations.  
doi:10.1371/journal.pcbi.1002548.g003

and 50% of wild type). Figure 3 shows that the ratio of the growth rates at 1 mM and 50 mM external potassium is much lower for the mutant strains than that of the wild type. These results are in line with the recent finding that the *brp1* mutant, which is a *PMA1* promoter deletion, that leads to decreased Pma1 protein levels, presents markedly decreased growth in low potassium medium and defective rubidium uptake [36].

The second prediction from the reverse tracking approach was an increased reaction flux for the bicarbonate system (Figure 2C). This prediction is supported experimentally by an increased mRNA expression of the *NCE103* gene coding for carbonic anhydrase, the enzyme catalyzing the bicarbonate reaction (Figure 2E). This result was part of a genome-wide transcriptomic analysis, using DNA microarrays, of the response to potassium starvation (0–120 min) to be published elsewhere (Barreto et al., submitted). It was shown earlier that protein and mRNA levels of carbonic anhydrase are highly correlated [37]. A qRT-PCR measurement confirmed the increase in *NCE103* expression in wild type cells shifted to K<sup>+</sup> free medium. After 60 minutes of potassium starvation, the *NCE103* mRNA levels increase more than four-fold ( $4.31 \pm 0.58, n = 3$  independent experiments). These results show that activation of both Pma1 and the bicarbonate reaction sequence are essential for the control of internal potassium concentrations. In non-starved cells the expression of *NCE103* is higher for the *trk1,2* double mutant than for the wild type (single dot in Figure 2E). A confirmatory semi-quantitative RT-PCR measurement using the same RNA sample as in the microarray experiment and one RNA sample from independent cultures yielded a mean expression ratio of  $4.1 \pm 0.82$  ( $n = 4$  data points) for *trk1,2* relative to the wild type. These results suggest a simple explanation for the reported hyperpolarization of the *trk1,2* double mutant [12]: A high activity of the bicarbonate reaction sequence means that many protons and many bicarbonate ions are produced. Together with a more active proton pump (Figures 2B and D), this results in a more negative membrane potential that counteracts the outwardly directed potassium gradient. The consequence is a higher intracellular concentration of potassium (Figure 1A) in *trk1,2* double mutants than wild type cells.

### Non-perfect adaptation to external potassium concentrations

Homeostatic control of a cellular function in response to a changing environment is often mediated by a negative feedback loop. A change in the input signal (e.g. the external potassium concentration) is counteracted by this feedback loop in order to keep an essential cellular quantity (e.g. the intracellular potassium concentration) in a range sufficient for the cell's function. One particular type of feedback is integral control, where the control signal is the time integral of the difference between the reference and the actual quantity [30]. Integral control was observed for a number of cellular processes including bacterial chemotaxis [38,39] and osmoregulation [20]. A characteristic property of integral control is perfect adaptation, where the steady state input is independent of the steady state output. For potassium this would mean, that the same intracellular potassium concentration (output) is approached irrespective of the extracellular potassium concentration (input).

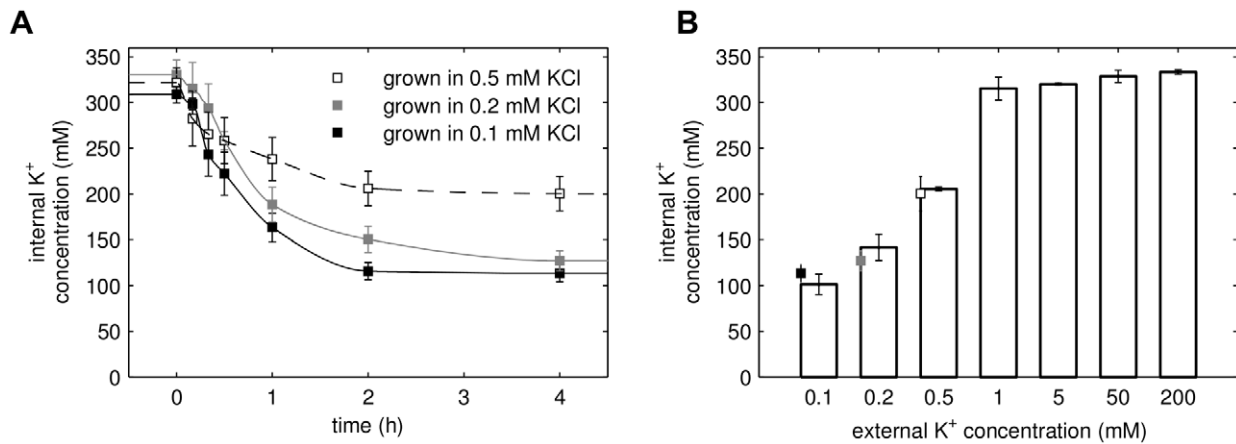
The activation of proton transport by Pma1 and the activation of the bicarbonate system counteracting low external potassium indicate the existence of a negative feedback loop. To further investigate this feedback, we have modified the potassium starvation experiment. As before, cells were grown at 50 mM external potassium, but now resuspended in media with different external potassium concentrations. The potassium efflux and the stationary internal concentrations are different for the different external concentrations, which is also reflected by the model (Figure 4A). To test whether these stationary intracellular concentrations are characteristic for the external potassium, we grew cells overnight in media with different external potassium concentrations (Figure 4B). When external potassium is plentiful (>1 mM), the internal concentration attains an upper limit of approx. 300 mM. For low external potassium (<1 mM), the internal concentration is proportional to the external and agrees with the stationary states of Figure 4A. These experiments show, that perfect adaptation by integral control is not a characteristic of potassium homeostasis for low external potassium. The molecular function and characteristics of this feedback have to be further explored.

### Discussion

In summary, we found that direct regulation of potassium transport proteins is not sufficient for the maintenance of viable potassium levels inside the cell. Although the presence of Trk1,2 influences the dynamics of potassium loss under conditions of low potassium, the regulation of their activity is not the main regulatory process. Cells lacking these proteins have higher intracellular potassium concentrations and the loss of potassium after a rapid shift to low external potassium is slower than in wild type cells. The adaptation to low potassium requires a rapid modulation of proton fluxes as a rescue operation via the increased production of bicarbonate and the activation of the H<sup>+</sup>-ATPase Pma1 (Figure 5). The observation that the internal steady state potassium concentration is determined by the external concentration indicates, that potassium homeostasis is an example of non-perfect adaptation, excluding the existence of integral control. The detailed sensing and signaling mechanisms remain to be elucidated and currently we cannot distinguish whether changes in internal or external potassium are sensed directly or indirectly, e.g., as changes of the membrane potential.

Although we cannot completely rule out the possibility that other transport systems not considered in the model contribute to homeostasis, we have reason to believe that our model covers the

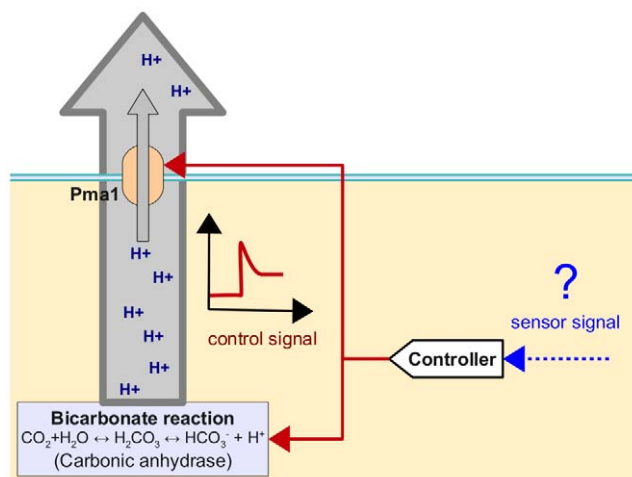




**Figure 4. Relationship of external and internal potassium.** (A) Cells grown in 50 mM KCl were resuspended in 0.1, 0.2 and 0.5 mM KCl and the time course of internal potassium was monitored. The lines show the data fit obtained from the reverse tracking algorithm. (B) Internal potassium concentration in cells grown overnight at different external potassium concentrations. The steady state concentrations from (A) are indicated as squares.

doi:10.1371/journal.pcbi.1002548.g004

dominant effects required for the maintenance of viable potassium levels under starvation conditions. All experiments were performed in the presence of calcium, which renders the activity of the calcium blocked non-selective cation pathway Nsc1 unlikely. In addition, non-specific transport of potassium is covered in the model by the leak current. The information about potassium storage in intracellular compartments in the literature is limited. To test the influence of intracellular potassium fluxes originating from an intracellular storage mechanism, we added a hypothetical compartment which can release potassium in response to starvation. This modification did not change the qualitative behavior of the model and was not sufficient to explain the slow efflux of potassium and the maintenance of sufficient intracellular potassium after starvation. Thus, we excluded this modification from the model.



**Figure 5. Proposed mechanism of potassium homeostasis.** Changes of the external potassium concentration are sensed by an unidentified sensor system either directly or indirectly, e.g. via the membrane potential, internal potassium or pH changes. The sensor signal triggers a modulation of proton fluxes using the bicarbonate reaction system and the Pma1 proton pump as regulators.

doi:10.1371/journal.pcbi.1002548.g005

Many cation transporters are evolutionarily conserved in other yeast species and even in higher plants [1–3]. However, the current knowledge for these organisms is not as detailed. Considering the importance of ion homeostasis for some pathogenic yeasts [40] and for the growth and development of plants, the question of whether the regulation of proton fluxes plays a similar dominant role as in *S.c.* is an interesting starting point for future research.

The development of dynamic mathematical models requires a compilation of all parts and processes which could potentially be important for a cellular mechanism under consideration. Other processes believed to be negligible are often lumped together in the parameter values of the model. The decision of which processes to incorporate or to neglect is often hampered by insufficient biological knowledge. Incorporating too many details is impractical and leads to overly complex models with many parameters and little predictive power. On the other extreme are simplistic models which potentially neglect important processes and cannot reproduce the experimental data. We believe that our strategy to start with such a minimal model and to infer unmodeled dynamics with a reverse tracking approach might be of broader interest in systems biology. The reverse tracking algorithm provides (i) candidate points of applications for regulatory signals not explicitly captured by the model and (ii) an estimate of the corresponding time dependent regulatory signal. We emphasize that these potential regulatory signals have to be checked for biological plausibility and have to be validated by experiments. It can be applied when the core model for the process of interest is “underfitted”, i.e. when it can not sufficiently reproduce the experimental data because other regulatory process influence the parameters in the model. Its main advantage is that it can be applied even when an explicit modeling of the processes generating these regulatory inputs is beyond reach. On the other hand, the algorithm can be used as a tool for prioritizing experiments. In combination with experiments, it also may help to indicate which model extensions are most promising.

## Materials and Methods

### Mathematical model

The basic structure of the mathematical model is given by Equations (1–5) in the Results section. Here we report the details

of the kinetic relationships. Parameter values, initial conditions and derivations are provided in the Text S1. In the following  $F$ ,  $R$  and  $T$  denote the Faraday constant, the gas constant and the temperature.

**Passive and secondary active potassium and proton transport.** The concentration and voltage dependent transport currents of the passive or secondary active potassium and proton transporters (Equations (6–11) below) are described by the Ohmian relation  $I = g(V_m - E)$ , where the conductivity  $g$  is either constant ( $I_K^{leak}$  and  $I_H^{leak}$ ) or a function of the membrane voltage (Trk1,2, Nha1, Tok1). The voltage dependent conductivity of the transporter  $X \in \{\text{Trk1,2, Nha1, Tok1}\}$  was described by the function

$$g(V_m) = \frac{g_X}{1 + \exp\left(d \times \frac{zF}{RT} (V_m - V_X^{1/2})\right)},$$

which can be derived from a simple model for the stochastic opening and closing of a transporter or channel [27,29,41]. The parameters  $d$ ,  $V_X^{1/2}$  and  $g_X$  for Tok1 were taken from the literature [42]; for Trk1,2 we estimated them from electrophysiological data [43]; see Figure S6 in Text S1. For Nha1 we assumed this voltage-dependent conductivity on the basis of [44]. This approach leads to the following transport kinetics (here  $z = 1$ )

$$I_K^{Trk1,2} = \frac{g_{Trk1,2} \times \mathcal{S}}{1 + e^{d_{Trk1,2} \times \frac{zF}{RT} (V_m - V_{Trk1,2}^{1/2})}} \times (V_m - E_{Trk1,2}) \quad (6)$$

$$I_K^{Nha1} = - \frac{g_{Nha1} \times \mathcal{S}}{1 + e^{d_{Nha1} \times \frac{zF}{RT} (V_m - V_{Nha1}^{1/2})}} \times (V_m - E_{Nha1}) \quad (7)$$

$$I_K^{Tok1} = \frac{g_{Tok1} \times \mathcal{S}}{1 + e^{d_{Tok1} \times \frac{zF}{RT} (V_m - V_{Tok1}^{1/2})}} \times (V_m - E_{Tok1}) \quad (8)$$

$$I_K^{K,leak} = g_{K,leak} \times \mathcal{S} \times (V_m - E_{K,leak}) \quad (9)$$

$$I_H^{Nha1} = -2 \times I_K^{Nha1} \quad (10)$$

$$I_H^{H,leak} = g_{H,leak} \times \mathcal{S} \times (V_m - E_{H,leak}) \quad (11)$$

with the equilibrium potentials

$$E_{Trk1,2} = E_{K,leak} = E_{Tok1} = \frac{RT}{zF} \ln \frac{[K^+]_o}{[K^+]_i} \quad (12)$$

$$E_{Nha1} = - \frac{RT}{zF} \ln \left( \frac{[K^+]_i}{[K^+]_o} \times \frac{[H^+]_o^2}{[H^+]_i^2} \right) \quad (13)$$

$$E_{H,leak} = E_H = \frac{RT}{zF} \ln \frac{[H^+]_o}{[H^+]_i} \quad (14)$$

The electric currents  $I$  are related to the mass fluxes  $J$  by

$$I = zF \frac{V}{A} J. \quad (15)$$

and the factor  $\mathcal{S} = A(0)/A(t)$  was introduced to correctly incorporate the dependence of the conductance parameters on the surface area  $A$  of the cell.

The transport current for Pma1 depends on the free energy  $\Delta G_{ATP}$  of ATP hydrolysis and was modeled as [45]

$$I_H^{Pma1} = I_{Pma1}^{max} \times \mathcal{S} \times \tanh \left( \frac{zF}{2RT} \left( V_m - \left( E_H + \frac{\Delta G_{ATP}}{F} \right) \right) \right). \quad (16)$$

**Bicarbonate reaction.** The model in [25] for the bicarbonate reaction sequence was supplemented by an effective metabolic carbon dioxide production or consumption flux  $J_{CO_2}^{prod}$ . The production rate  $J_{CO_2}^{prod}$  is an input to the model. Note that the production changes with the volume even if the amount of produced  $CO_2$  does not change. This is taken into account by the relationship

$$J_{CO_2}^{prod} = \tilde{J}_{CO_2}^{prod} \times \frac{V(0)}{V(t)}, \quad (17)$$

where  $V(0)$  denotes the initial volume and  $\tilde{J}_{CO_2}^{prod}$  is the volume independent rate, which is input to the model.

The dynamics of  $CO_2$  in Equation (2) depends also on the transport fluxes for carbonic acid and bicarbonate

$$J_{H_2CO_3}^{transport} = \frac{P_{H_2CO_3}}{-\mathcal{R}} ([H_2CO_3]_o - [H_2CO_3]_i) \quad (18)$$

$$J_{HCO_3^-}^{transport} = \frac{P_{HCO_3^-}}{-\mathcal{R}} \frac{V_m F}{RT} \times \frac{[HCO_3^-]_o - [HCO_3^-]_i e^{-\frac{V_m F}{RT}}}{1 - e^{-\frac{V_m F}{RT}}}. \quad (19)$$

The parameters  $P_{H_2CO_3}$  and  $P_{HCO_3^-}$  are permeabilities for carbonic acid and bicarbonate respectively, and  $\mathcal{R}$  is the volume to surface ratio of the cell, see Text S1. The assumption behind Equation (18) is that the flux of carbonic acid is proportional to its concentration gradient. Equation (19) is a Goldman-Hodgkin-Katz flux equation for the electrodiffusive transport of ions across the membrane [25,41].

The fraction of total undissociated carbon dioxide

$$\alpha = \frac{[H^+]_i}{[H^+]_i + 10^{-pK_A}} \quad (20)$$

( $pK_A$  of carbonic anhydrase) enters the rate of proton production in Equation (3), see Text S1 for a detailed derivation. The production fluxes of carbonic acid and bicarbonate

$$J_{H_2CO_3}^{prod} = \alpha \times J_{CO_2}^{prod} \quad (21)$$

$$J_{HCO_3^-}^{prod} = (1 - \alpha) \times J_{CO_2}^{prod} \quad (22)$$

depend on  $\alpha$  and on the production rate of carbon dioxide  $J_{CO_2}^{prod}$ .

**Cell volume.** For the dynamics of the cell volume (Equation (5)) we used a model from the literature [28] which is based on the balance of internal and external osmotic pressure ( $\Pi_i$  and  $\Pi_o$ ) and turgor pressure ( $\Pi_t$ ):

$$\Pi_o = ([K^+]_o + [H^+]_o + [Cl^-]_o + [CO_2]_o + [X]_o) \times RT \quad (23)$$

$$\Pi_i = \frac{V}{V - f_V \times V(0)} \times ([K^+]_i + [H^+]_i + [CO_2]_i + [X]_i) \times RT \quad (24)$$

$$\Pi_t = \Pi_t(0) \times \frac{V - k_V \times V(0)}{V(0) - k_V \times V(0)} \quad (25)$$

$$\Pi_t(0) = \Pi_t(0) - \Pi_o(0). \quad (26)$$

Here,  $k_V$  is the fraction of the non-osmotic cell volume and  $f_V$  determines the elasticity of the cell wall. The internal and external concentration  $[X]_{i,o}$  of other osmotically active substances are constant (see Text S1). A cell volume simulation for wildtype and *trk1,2* mutant can be found in Figure S5 in Text S1.

**Potassium starvation.** The external potassium concentration  $[K^+]_o$  is an input to the model. The shift from a medium containing 50 mM KCl to the starvation medium was described by

$$[K^+]_{o,t} = [Cl^-]_{o,t} = \begin{cases} 0.05 \frac{\text{mmol}}{\text{cm}^3}, & \text{for } t < 0 \text{ sec.} \\ 15 \times 10^{-6} + (0.05 - 15 \times 10^{-6}) \times \exp\left(-\left(\frac{t}{\sigma}\right)^2\right) \frac{\text{mmol}}{\text{cm}^3}, & \text{otherwise} \end{cases} \quad (27)$$

with  $\sigma = 0.04 \times 60^2$  sec.

### Reverse tracking algorithm

Equations (1–5) have the form of a differential algebraic control system

$$\dot{x} = f(x(t), u(t), \theta), \quad g(x(t), u(t), \theta) = 0 \quad (28)$$

with  $f, g: \mathbb{R}^n \times \mathbb{R} \times \mathbb{R}^p \rightarrow \mathbb{R}^n$ . Here,  $x$  denotes the dynamical variables ( $x = ([K^+]_i, pH_i, [CO_2]_i, V)$ ) and Equation (4) for the membrane potential corresponds to the algebraic equation  $g(x, u, \theta) = 0$ . The scalar input function  $u$  is given by the external potassium concentration  $u(t) = [K^+]_o(t)$ . The solution of this system for given values of the parameters  $\theta \in \mathbb{R}^p$  and a given input function  $u(t)$  is denoted by  $x(t, u(t), \theta)$ . Assume now, that we can observe  $m \leq n$  of the components  $x_i$  of  $x$  experimentally. We collect the experimentally observable components in  $y \in \mathbb{R}^m$ . This can be written as  $y = Cx$  with a  $m \times n$  matrix  $C$  with binary elements  $c_{ij} \in \{0, 1\}$ . For an experimentally observable variable  $x_i = y_j$  the  $i$ -th column of  $C$  has a single entry  $c_{ji} = 1$  and  $\sum_j c_{ji} = 1$ . A zero column with  $\sum_j c_{jk} = 0$  indicates that  $x_k$  can not experimentally be observed and is thus excluded from  $y$ .

Assume further, that we have experimental data  $y^{exp}(t_k)$  for certain time points  $t_k$  in response to the known input function  $u(t)$ . Most parameter estimation techniques aim to minimize the squared error

$$E(u, \theta) = \sum_k \|y^{exp}(t_k) - y(t_k)\|^2 \quad \text{with}$$

$$\|y^{exp}(t_k) - y(t_k)\|^2 = \sum_{j=1}^n (y_j^{exp}(t_k) - y_j(t_k))^2$$

over the parameter vector  $\theta$  in order to bring the model prediction  $y(t_k) = y(t_k, u(t), \theta)$  for a given input  $u(t)$  close to the experimental data  $y^{exp}(t_k)$ . However, it might be the case that the minimum error  $E(u(t), \theta^*) = \min_{\theta} E(u(t), \theta)$  is still too large so that the model cannot be regarded as a reasonable description of the data. This could mean that a dynamical process not explicitly accounted for renders at least one component  $\theta_l$  of the parameter vector  $\theta$  to be a time dependent function instead of being constant. The reverse tracking algorithm aims (i) to identify, which of the components  $\theta_l$  of  $\theta$  are *potentially* time dependent and (ii) to predict the time course  $\theta_l(t)$  which minimizes the error. Although the unmodeled dynamical process might effect more than one component, we consider for simplicity each component  $\theta_l$  separately and solve the problem

$$\min_{\theta_l(t)} E(u, \theta_l(t), \theta_l^*) \quad (29)$$

subject to the constraints

$$\dot{x} = f\left(x, u(t), \left(\theta_l(t), \theta_l^*\right)\right), \quad g\left(x, u(t), \left(\theta_l(t), \theta_l^*\right)\right) = 0, \quad y = Cx$$

for each component  $\theta_l$  separately. Here,  $\theta_l$  denotes the parameter vector  $\theta$  with the  $l$ -th component excluded. We then regard  $\theta_l(t)$  as a potential regulatory input, if the problem (29) has a solution with a minimum error smaller than a predefined threshold  $\varepsilon > 0$ :  $\min_{\theta_l(t)} E(u, \theta_l(t), \theta_l^*) < \varepsilon$ . There might be more than one potential regulatory input  $\theta_l(t)$  and the decision of which of these are real can only be made from biological considerations or from additional validation experiments. For example, it might be that  $\theta_l(t)$  has a huge magnitude or takes unrealistic values which could be used to exclude  $\theta_l(t)$  from the list of potential regulatory inputs.

Mathematically, problem (29) is an optimal tracking problem, which often can be solved by a feedback control law [46]. This means that the function  $\theta_l(t)$  is updated according to the local error  $y(t) - y^{exp}(t)$  at time  $t$ . For a scalar  $y$  we found the integral controller [30]

$$\frac{d}{dt} \theta_l = \eta (y(t) - y^{exp}(t)) \quad (30)$$

to be a good solution. During a reverse tracking run, this equation is numerically integrated in parallel with the dynamic equations (28). Here,  $y^{exp}(t)$  is a least squares spline fit to the experimental data points  $y^{exp}(t_k)$ . Details and suitable parameter values for  $\eta$  are provided in the Text S1.

### Strains and medium

Details about the wildtype strain BY4741, the related *trk1,2* mutant and the Translucent  $K^+$  free medium can be found in [12,21].

### Potassium starvation experiments and concentration measurements

Cells were grown in Translucent  $K^+$ -free medium supplemented with the indicated amount of KCl to an OD600 of 0.4–0.6.

Intracellular potassium concentrations were measured by atomic emission spectrometry after extracting the cells with acid as previously described [12]. The time course of internal potassium was obtained by growing the cells in 50mM KCl, then cells were washed with Translucent K<sup>+</sup>-free medium (traces of KCl left: 15μM) and resuspended to the same K<sup>+</sup> free medium or containing the indicated KCl concentrations. Apart from the washing procedure the medium contains 2% glucose.

### Gene expression measurements for *NCE103* coding for carbonic anhydrase

Data for *NCE103* expression changes upon potassium starvation was obtained in the context of a genome-wide transcriptomic analysis by DNA microarray (Barreto *et al.*, Manuscript submitted). Microarray data has been deposited at NCBI's Gene Expression Omnibus [47] and are accessible through GEO Series accession numbers GSE24711 (trk1 trk2 data) and GSE24712 (time-course data). Briefly, wild-type strain BY4741 cells were grown in Translucent medium supplemented with 50 mM KCl to OD 0.8. Cells were centrifuged and resuspended either in fresh Translucent medium with 50 mM KCl or without potassium. Samples (20 ml) were taken at 10, 20, 40, 60 and 120 min by rapid filtration from 4 biological replicates. Total RNA was extracted by using the Ribo Pure™ Yeast kit (Ambion) following the manufacturers instructions. cDNA was prepared and indirectly labeled with Cy3 and Cy5. Images with a resolution of 10 μm were analyzed with the GenePix Pro 6.0 software (Molecular Devices).

Microarray data was confirmed by qRT-PCR using independent RNA samples. To this end, 60 ng of RNA were amplified using oligonucleotides RT\_ *NCE103*\_5 (TCATTACCTGTCC-CACTG) and RT\_ *NCE103*\_3 (CACAAAAGTTACCCCAAAA) and the QuantiTect SYBR Green PCR Kit (Qiagen).

### Membrane isolation and determination of Pma1 activity

Cell cultures were grown at 28°C in Translucent YNB medium containing 50mM KCl to OD660 0.6, then washed with Translucent K<sup>+</sup>- free medium and resuspended in the same medium without KCl. At the indicated times, cell samples were pelleted by centrifugation, resuspended in 100μl of fresh media (with KCl for t=0 and without KCl for the remaining samples), incubated for 5 minutes and frozen in liquid nitrogen. For the crude membrane purification, 100μl of 3× extraction buffer (0.3 M Tris-HCl pH 8.0, 180 mM KCl, 30 mM EDTA, 6 mM DTT and Protease Inhibitor Cocktail (Roche)) was added to the thawed samples and cells were broken by vortexing in the presence of an equal volume of glass beads. 600μl of GTED20 buffer (20%

glycerol, 10 mM Tris-HCl pH 7.6, 1 mM EDTA and 1 mM DTT) were added to the crude extract, which was then centrifuged 5 minutes at 2000 rpm. The supernatant was transferred to a new tube and centrifuged 20 minutes at 13000 rpm. The insoluble fraction was resuspended and homogenized in 100μl of GTED20. The total amount of protein present was estimated using the Bradford assay (BioRad). The amount of Pma1 present in this protein fraction was estimated by comparing the amount of Pma1 to a protein standard curve separated in SDS-PAGE gels stained with Coomassie Blue. In a microtiter plate, 6μg of total protein (which corresponds to 0.3μg of Pma1) were assayed in the presence and absence of a Pma1-specific inhibitor, diethylstilbestrol (DES, final concentration 0.2 mM). The reaction was started by adding 65μl of the reaction buffer (50 mM MES-Tris pH 5.7, 5 mM MgSO<sub>4</sub>, 50 mM KNO<sub>3</sub>, 5 mM Na Azide, 0.3 mM Molybdate, 2 mM ATP) and the plate was incubated for 20 minutes at 30°C. The reaction was stopped by adding 130μl of detection solution (2% sulphuric acid, 0.5% ammonium molybdate, 0.5% SDS, 0.1% ascorbic acid) and the color was allowed to develop for 5 minutes before reading the absorbance in microplate reader (BioRad) at 750 nm. Residual activity values in the presence of DES were subtracted from the absolute activity values to obtain the Pma1 activity measurements. The results represent the average of at least 4 measurements at each time point and essentially identical results were observed in two separate experiments. Measurements of Pma1 activity are expressed in mmol/min/g Pma1. Error bars represent the standard deviation.

### Supporting Information

**Text S1** Supporting text containing additional information about the mathematical model. (PDF)

### Acknowledgments

The authors thank Hana Sychrova, Hella Lichtenberg, Joachim Ernst, Jost Ludwig, Wolfgang Alt and Milan Höfer for many useful discussions.

### Author Contributions

Conceived and designed the experiments: M. Kahm, L. Yenush, J. Ariño, J. Ramos, M. Kschischo. Performed the experiments: C. Navarrete, V. Llopis-Torregrosa, R. Herrera, L. Barreto, J. Ramos. Analyzed the data: M. Kahm, J. Ariño, J. Ramos, M. Kschischo. Contributed reagents/materials/analysis tools: M. Kahm, L. Yenush, J. Ariño, J. Ramos, M. Kschischo. Wrote the paper: M. Kahm, L. Yenush, J. Ariño, J. Ramos, M. Kschischo. Developed the mathematical model: M. Kahm, M. Kschischo.

### References

- Blatt M, Slayman C (1987) Role of active potassium transport in the regulation of cytoplasmic pH by nonanimal cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 84: 2737–2741.
- Rodríguez-Navarro A (2000) Potassium transport in fungi and plants. *Biochim Biophys Acta* 1469: 1–30.
- Ariño J, Ramos J, Sychrova H (2010) Alkali-metal-cation transport and homeostasis in yeasts. *Microbiol Mol Biol Rev* 74: 95–120.
- Merchan S, Peddelini L, Hueso G, Calzada A, Serrano R, et al. (2011) Genetic alterations leading to increases in internal potassium concentrations are detrimental for DNA integrity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Cells* 16: 152–165.
- Buch-Pedersen MJ, Rudashevskaya EL, Berner TS, Venema K, Palmgren MG (2006) Potassium as an intrinsic uncoupler of the plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase. *J Biol Chem* 281: 38285–38292.
- Serrano R (1983) In vivo glucose activation of the yeast plasma membrane ATPase. *FEBS Lett* 156: 11–14.
- Ko CH, Buckley AM, Gaber RF (1990) TRK2 is required for low affinity K<sup>+</sup> transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 125: 305–312.
- Ramos J, Alijo R, Haro R, Rodríguez-Navarro A (1994) TRK2 is not a low-affinity potassium transporter in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol* 176: 249–252.
- Bihler H, Slayman CL, Bertl A (1998) NSC1: A novel high-current inward rectifier for cations in the plasma membrane of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett* 432: 59–64.
- Roberts SK, Fischer M, Dixon GK, Sanders D (1999) Divalent cation block of inward currents and low-affinity K<sup>+</sup> uptake in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol* 181: 291–297.
- Bañuelos M, Ruiz M, Jiménez A, Soucier JL, Potier S, et al. (2002) Role of the Nha1 antiporter in regulating K<sup>+</sup> influx in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 19: 9–15.
- Navarrete C, Petrežselyová S, Barreto L, Martínez J, Zahrádka J, et al. (2010) Lack of main K<sup>+</sup> uptake systems in *S. cerevisiae* cells affects yeast cell physiological parameters both in potassium sufficient and limiting conditions. *FEMS Yeast Res* 10: 508–517.
- Haro R, Garcíadeblas B, Rodríguez-Navarro A (1991) A novel P-type ATPase from yeast involved in sodium transport. *FEBS Lett* 291: 189–191.
- Márquez JA, Serrano R (1996) Multiple transduction pathways regulate the sodium-extrusion gene *PMR2/ENA1* during salt stress in yeast. *FEBS Lett* 382: 89–92.
- Ruiz A, Ariño J (2007) Function and regulation of the *Saccharomyces cerevisiae* ENA sodium ATPase system. *Eukaryot Cell* 6: 2175–2183.

16. Bertl A, Slayman CL, Gradmann D (1993) Gating and conductance in an outward-rectifying  $K^+$  channel from the plasma membrane of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Membr Biol* 132: 183–199.
17. Martínez-Muñoz GA, Peña A (2005) In situ study of  $K^+$  transport into the vacuole of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 22: 689–704.
18. López R, Enríquez E, Peña A (1999) Effects of weak acids on cation accumulation,  $\Delta pH$  and  $\Delta \Psi$  in yeast. *Yeast* 15: 553–562.
19. Hess DC, Lu W, Rabinowitz JD, Botstein D (2006) Ammonium toxicity and potassium limitation in yeast. *PLoS Biol* 4: 2012–2023.
20. Muzzey D, Gómez-Urbe CA, Mettetal JT, van Oudenaarden A (2009) A systems-level analysis of perfect adaptation in yeast osmoregulation. *Cell* 138: 160–171.
21. Petrešelyová S, Zahradka J, Sychrová H (2010) *Saccharomyces cerevisiae* BY4741 and W303-1A laboratory strains differ in salt tolerance. *Fungal Biol* 114: 144–150.
22. Casado C, Yenush L, Melero C, del Carmen Ruiz M, Serrano R, et al. (2010) Regulation of Trk dependent potassium transport by the calcineurin pathway involves the Hal5 kinase. *FEBS Lett* 584: 2415–2420.
23. Mulet JM, Leube MP, Kron SJ, Rios G, Fink GR, et al. (1999) A novel mechanism of ion homeostasis and salt tolerance in yeast: the Hal4 and Hal5 protein kinases modulate the Trk1-Trk2 potassium transporter. *Mol Cell Biol* 19: 3328–3337.
24. Yenush L, Merchan S, Holmes J, Serrano R (2005) pH-responsive, posttranslational regulation of the Trk1 potassium transporter by the type 1-related Ppz1 phosphatase. *Mol Cell Biol* 25: 8683–8692.
25. Boron W, de Weer P (1976) Intracellular pH transients in squid giant axons caused by  $CO_2$ ,  $NH_3$  and metabolic inhibitors. *J Gen Physiol* 67: 91–112.
26. Boron WF (2004) Regulation of intracellular pH. *Adv Physiol Educ* 28: 160–179.
27. Keener J, Sneyd J (2004) *Mathematical Physiology*. New York: Springer.
28. Gennemark P, Nordlander B, Hohmann S, Wedlin D (2006) A simple mathematical model of adaption to high osmolarity in yeast. *In Silico Biol* 6: 34.
29. Weiss TF (1996) *Cellular Biophysics - Transport*. Cambridge: Bradford.
30. Åström KJ, Murray RM (2009) *Feedback Systems*. Princeton and Oxford: Princeton University Press.
31. Yenush L, Mulet JM, Ariño J, Serrano R (2002) The Ppz protein phosphatases are key regulators of  $K^+$  and pH homeostasis: implications for salt tolerance, cell wall integrity and cell cycle progression. *EMBO J* 21: 920–929.
32. Bihler H, Slayman CL, Bertl A (2002) Low-affinity potassium uptake by *Saccharomyces cerevisiae* is mediated by NSC1, a calcium-blocked non-specific cation channel. *Biochim Biophys Acta* 1558: 109–118.
33. Serrano R (1978) Characterization of the plasma membrane ATPase of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biochem* 22: 51–63.
34. Portillo F, Serrano R (1988) Dissection of functional domains of the yeast proton-pumping ATPase by directed mutagenesis. *EMBO J* 7: 1793–1798.
35. Vallejo CG, Serrano R (1989) Physiology of mutants with reduced expression of plasma membrane  $H^+$ -ATPase. *Yeast* 5: 307–319.
36. Barreto L, Canadell D, Petrešelyová S, Navarrete C, Maresová L, et al. (2011) A genomewide screen for tolerance to cationic drugs reveals genes important for potassium homeostasis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryot Cell* 10: 1241–1250.
37. Amoroso G, Morell-Avrahov L, Müller D, Klug K, Sültemeyer D (2005) The gene NCE103 (YNL036w) from *Saccharomyces cerevisiae* encodes a functional carbonic anhydrase and its transcription is regulated by the concentration of inorganic carbon in the medium. *Mol Microbiol* 56: 549–558.
38. Barkai N, Leibler S (1997) Robustness in simple biochemical networks. *Nature* 387: 913–917.
39. Yi TM, Huang Y, Simon MI, Doyle J (2000) Robust perfect adaptation in bacterial chemotaxis through integral feedback control. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 4649–4653.
40. Miranda M, Bashi E, Vylkova S, Edgerton M, Slayman C, et al. (2009) Conservation and dispersion of sequence and function in fungal TRK potassium transporters: focus on *Candida albicans*. *FEMS Yeast Res* 9: 278–292.
41. Hille B (2001) *Ion channels of excitable membranes*. Sunderland: Sinauer.
42. Johansson I, Blatt M (2006) Interactive domains between pore loops of the yeast  $K^+$  channel Tok1 associate with extracellular  $K^+$  sensitivity. *Biochem J* 393: 645–655.
43. Kuroda T, Bihler H, Bashi E, Slayman C, Rivetta A (2004) Chloride channel function in the yeast Trk-potassium transporters. *J Membr Biol* 198: 177–192.
44. Ohgaki R, Nakamura N, Mitsui K, Kanazawa H (2005) Characterization of the ion transport activity of the budding yeast  $Na^+/H^+$  antiporter, Nha1p, using isolated secretory vesicles. *Biochim Biophys Acta* 1712: 185–196.
45. Endresen LP, Hall K, Hoye JS, Myrheim J (2000) A theory for the membrane potential of living cells. *Eur Biophys J* 29: 90–103.
46. Xian B, Dawson DM, de Queiroz MS, Chen J (2003) A continuous asymptotic tracking control strategy for uncertain multi-input nonlinear systems. In: *Proceedings of Intelligent Control 2003 IEEE Int Symp*; 8 October 2003. pp. 52–57. doi:10.1109/ISIC.2003.1253913.
47. Edgar R, Domrachev M, Lash AE (2002) Gene expression omnibus: Ncbi gene expression and hybridization array data repository. *Nucleic Acids Res* 30: 207–210.

# A Genomewide Screen for Tolerance to Cationic Drugs Reveals Genes Important for Potassium Homeostasis in *Saccharomyces cerevisiae*<sup>∇†</sup>

Lina Barreto,<sup>1</sup> David Canadell,<sup>1</sup> Silvia Petrežsélyová,<sup>2</sup> Clara Navarrete,<sup>3</sup> Lydie Marešová,<sup>2</sup>  
Jorge Pérez-Valle,<sup>4</sup> Rito Herrera,<sup>3</sup> Iván Olier,<sup>5</sup> Jesús Giraldo,<sup>5</sup> Hana Sychrová,<sup>2</sup>  
Lynne Yenush,<sup>4</sup> José Ramos,<sup>3</sup> and Joaquín Ariño<sup>1\*</sup>

*Institut de Biotecnologia i Biomedicina, and Departament de Bioquímica i Biologia Molecular, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra 08193, Barcelona, Spain*<sup>1</sup>; *Department of Membrane Transport, Institute of Physiology, Academy of Sciences of the Czech Republic v.v.i., Prague, Czech Republic*<sup>2</sup>; *Departamento de Microbiología, Universidad de Córdoba, Campus Rabanales, Edif. Severo Ochoa (C6), Córdoba, Spain*<sup>3</sup>; *Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas, UPV-CSIC, Universitat Politècnica de Valencia, Valencia 46022, Spain*<sup>4</sup>; and *Institut de Neurociències, and Unitat de Bioestadística, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain*<sup>5</sup>

Received 11 March 2011/Accepted 18 June 2011

**Potassium homeostasis is crucial for living cells. In the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, the uptake of potassium is driven by the electrochemical gradient generated by the Pma1 H<sup>+</sup>-ATPase, and this process represents a major consumer of the gradient. We considered that any mutation resulting in an alteration of the electrochemical gradient could give rise to anomalous sensitivity to any cationic drug independently of its toxicity mechanism. Here, we describe a genomewide screen for mutants that present altered tolerance to hygromycin B, spermine, and tetramethylammonium. Two hundred twenty-six mutant strains displayed altered tolerance to all three drugs (202 hypersensitive and 24 hypertolerant), and more than 50% presented a strong or moderate growth defect at a limiting potassium concentration (1 mM). Functional groups such as protein kinases and phosphatases, intracellular trafficking, transcription, or cell cycle and DNA processing were enriched. Essentially, our screen has identified a substantial number of genes that were not previously described to play a direct or indirect role in potassium homeostasis. A subset of 27 representative mutants were selected and subjected to diverse biochemical tests that, in some cases, allowed us to postulate the basis for the observed phenotypes.**

In yeast cells, the secondary active transport of inorganic ions and diverse nutrients relies on the existence of an electrochemical gradient of protons across the plasma membrane, which is generated by P<sub>2</sub>-type, energy-consuming H<sup>+</sup>-ATPases. In the model yeast *Saccharomyces cerevisiae*, there is an essential H<sup>+</sup>-ATPase gene, *PMA1*, which encodes one of the most abundant proteins in the yeast plasma membrane (45). The electrochemical gradient generated by Pma1 is balanced by the activity of a number of symporters and antiporters, and high-affinity potassium uptake is the principal consumer of the gradient (17, 25). High-affinity potassium uptake, which allows yeast cells to concentrate the cation even when it is present at very low concentrations (<50 μM), is mediated by the plasma membrane transporters Trk1 and Trk2. Several studies have established that the Trk1 transporter, which has a tetra-M1PM2 structure (19), is the most biologically relevant membrane transporter (14, 23, 38). Thus, a *trk1* mutant (but not *trk2* cells) is deficient for high-affinity potassium uptake and cannot grow when the external potassium concentration is limiting (1 to 2 mM). A *trk1 trk2* double mutant strain shows an

increased threshold for external potassium. These cells also exhibit low-affinity Rb<sup>+</sup> uptake and a hyperpolarized plasma membrane (25). Potassium transport into yeast cells results in a depolarization of the plasma membrane, leading to the stimulation of Pma1 activity and a concomitant cytosolic alkalinization (40).

The regulation of the activities of both Pma1 and Trk1 is fundamental for the modulation of the electrical membrane potential, although the precise regulatory mechanisms involved remain largely unknown. Pma1 can be regulated at the transcriptional level by the transcription factors Rap1 and Grc1, which mediate the increase in *PMA1* expression levels triggered by glucose metabolism (39), and by Mcm1, which connects the expression of the Pma1 proton pump with cell cycle regulatory pathways (24). Pma1 activity is regulated by the Ptk2 and Hrk1 protein kinases in response to glucose metabolism. Remarkably, a *ptk2* mutant exhibits a pleiotropic phenotype of tolerance to toxic cations, including sodium, lithium, manganese, tetramethylammonium (TMA), hygromycin B, and norspermidine (7, 17). In contrast, the phosphorylation of Pma1 by the Yck1 and Yck2 kinases results in decreased proton pump activity (10).

The molecular mechanisms modulating Trk1 activity have remained largely elusive. Hal4 and Hal5, a pair of partially redundant protein kinases, were shown previously to activate K<sup>+</sup> transport in a Trk-dependent manner (31), suggesting the direct regulation of Trk1 activity by phosphorylation. In addition, recent work has revealed that one role of these kinases is

\* Corresponding author. Mailing address: Institut de Biotecnologia i Biomedicina, Universitat Autònoma de Barcelona, Cerdanyola del Vallès 08193, Barcelona, Spain. Phone: 34-93-5812182. Fax: 34-93-5812011. E-mail: Joaquin.Ariño@uab.es.

† Supplemental material for this article may be found at <http://ec.asm.org/>.

<sup>∇</sup> Published ahead of print on 1 July 2011.



to stabilize Trk1 (and other permeases) at the plasma membrane under low-potassium conditions (34), thus underscoring the relevance of protein transport and recycling mechanisms in cation homeostasis. In this context, Arl1, a G protein of the Ras superfamily, was proposed to affect  $K^+$  uptake through the regulation of Hal4/Hal5 (32). On the other hand, it is known that Hal3, through the regulation of the protein phosphatase Ppz1, can activate Trk1-mediated potassium transport (6, 12, 51). Although no mechanistic details are available, it was shown previously that Ppz1 physically interacts with Trk1 and that the association between Hal3 and Ppz1 is responsive to changes in the intracellular pH (50). Calcineurin, a calcium-activated phosphatase, was reported previously to be necessary for the transition of Trk1 from the low- to the high-potassium-affinity state in response to sodium stress (30), although this phosphatase may also be required for the regulation of basal activity (3). Finally, the Sky1 protein kinase was reported to affect potassium uptake, although there is some controversy regarding whether or not this occurs in a Trk1,2-dependent manner (8, 9, 13).

The reported evidence suggests that the regulation of the best-characterized components involved in the maintenance of the electrochemical gradient could be a very complex issue, which is far from being solved. In this context, we wished to develop a novel approach to gain further insight into this process. We observed that a common feature of mutations leading to alterations in the electrochemical gradient was a phenotype of abnormal sensitivity to toxic cations. Thus, mutations affecting Pma1 or Trk function (i.e., *trk1,2*, *sky1*, *hal4,5*, *ptk2*, and *ppz1*) resulted in increased or decreased tolerance to these compounds (13, 17, 31, 32, 51). According to the concept developed previously by Goossens et al. (17), we considered that any mutant displaying altered tolerance concurrently to diverse toxic cations, differing in the specific uptake transport system and toxicity mechanism(s), would probably reflect a change in the electrochemical gradient and, hence, would identify a relevant component in this fundamental process. Therefore, we screened the *S. cerevisiae* haploid deletion library for mutants showing enhanced sensitivity/tolerance simultaneously to three toxic cations: hygromycin B, spermine, and TMA. Here, we report the results of this screen, which identified mutants lacking not only many of the expected genes but also a large number of genes encoding proteins previously unrelated to this process. We also present specific examples in which the molecular basis for these phenotypes is investigated.

#### MATERIALS AND METHODS

**Escherichia coli and yeast growth conditions.** *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  cells were used as the plasmid DNA host and were grown at 37°C in Luria-Bertani (LB) broth. The LB medium was supplemented with 50  $\mu$ g/ml ampicillin when plasmid selection was required. Bacterial and yeast cells were transformed by use of standard methods, and recombinant DNA techniques were performed as described elsewhere previously (43).

Unless stated otherwise, yeast cells were grown at 28°C in Translucent medium (catalog number CYN7505; Formedium, United Kingdom), prepared as described previously (33) and containing in each case the specified concentration of KCl. Translucent medium is a yeast nitrogen base (YNB)-based medium that has been reformulated to contain negligible amounts of potassium (usually <15  $\mu$ M). Yeast extract-peptone-dextrose (YPD) medium contains 1% (wt/vol) yeast extract, 2% (wt/vol) peptone, and 2% (wt/vol) glucose. Arginine-phosphate medium was prepared as described previously (41). For the testing of the growth of yeast mutants under conditions of limiting potassium concentrations, cells were

grown in Translucent medium supplemented with 50 mM KCl until saturation. The cells were then diluted to an optical density at 600 nm ( $OD_{600}$ ) of 0.004 in the same medium supplemented with 50 mM or 1 mM KCl and incubated at 28°C. The  $OD_{600}$  was measured after 16 h of incubation. In all experiments, control samples of the wild-type strain grown in medium supplemented with both 50 mM and 1 mM KCl were analyzed in parallel with the mutants, and the growth percentage values were determined relative to the growth of each mutant in 50 mM KCl. The value for wild-type cells was around 70% for the BY4741 genetic background.

**Screen of the systematic deletion library for changes in tolerance to hygromycin B, spermine, and TMA.** The systematic KanMX deletion library constructed in the BY4741 background was grown to saturation in YPD liquid medium supplemented with G418 (150  $\mu$ g/ml) for 3 to 4 days. The cultures were replicated by using a stainless steel 96-pin replicator (Nalge Nunc International) at a density of 384 clones/plate on Onmigrad plates (Nunc) containing YPD agar or YPD agar supplemented with hygromycin B (40 and 60  $\mu$ g/ml), spermine (0.6 and 0.7 mM), or TMA (0.5 and 0.6 M). Growth was visually evaluated and recorded after 48 h. Clones that showed strong, weak, or no macroscopic growth in the supplemented media after 48 h were considered putative positive clones. In order to confirm their sensitivity, these clones were recovered from the original 96-well plates, diluted with YPD medium to an  $OD_{600}$  of 0.05, and evaluated for sensitivity by a drop test on YPD plates supplemented with different concentrations of each toxic cation (20, 30, 40, 50, and 60  $\mu$ g/ml hygromycin B; 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, and 0.7 mM spermine; and 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, and 0.6 M TMA). The intensity of the phenotype was scored from 1 to 10 (most to least sensitive; for the wild-type strain the value was 6), on the basis of the lowest concentration of each toxic cation at which the strain showed no or marginal growth after 48 h.

**Proton efflux.** Proton pumping by whole yeast cells was measured by recording the extracellular pH change after the addition of glucose, as previously described (44). Briefly, cells were grown to the mid-log phase ( $OD_{600}$  of 0.8) in YPD medium, washed three times with distilled water, and stored on ice for 1 to 3 h. After that, cells were pelleted by centrifugation and resuspended in 2 ml of glycyl-glycine solution (10 mM glycyl-glycine and 100 mM KCl [pH 4.5, adjusted with HCl]). Six milliliters of glycyl-glycine solution was mixed with 1.8 ml of cell suspension in a Falcon tube with constant agitation. A pH electrode was suspended in the cell mixture, and the pH was measured until a stable baseline was obtained. Glucose was then added to a final concentration of 20 mM. The pH was read every 10 s with a GLP21 pH meter (Crison) until a new steady state was reached, usually at 20 min. Acidification values were calculated from the linear segment of the curve.

**Rubidium transport.**  $Rb^+$  was used as a  $K^+$  transport analog (41). The time course of  $Rb^+$  uptake was studied for cells grown at normal  $K^+$  levels and for  $K^+$ -starved cells. Normal  $K^+$  cells were obtained by growing yeasts overnight in Translucent medium supplemented with 50 mM KCl. The cells were then suspended in the same fresh medium at an  $OD_{600}$  of 0.2. After 2 h of incubation 50 mM  $RbCl$  was added to the medium (time zero), and samples of cells were withdrawn at the indicated time points. The  $Rb^+$  content of cells was determined by collecting the cells onto Millipore filters, which were rapidly washed with 20 mM  $MgCl_2$ . The cells were then extracted with acid and analyzed by atomic emission spectrophotometry (41).  $K^+$ -starved cells were prepared by incubating cells grown as mentioned above in Translucent  $K^+$ -free medium during 2 h.  $RbCl$  (0.5 mM) was then added, and samples of cells were taken and treated as mentioned above.

**Measurement of relative plasma membrane potential.** The fluorescence assay of the plasma membrane potential was performed as described previously (29). All strains were grown overnight in Translucent medium supplemented with 50 mM KCl to the exponential growth phase. Cells were harvested and washed twice with 10 mM  $Na_2HPO_4$  (pH 6.0, adjusted with citric acid) and resuspended in the same buffer to a final  $OD_{600}$  of 0.2. A potential-sensitive dye, diS-C<sub>3</sub>(3) (3,3'-dipropylthiobarbiturate iodide) (0.1 mM stock solution in ethanol), was added to 3 ml of the cell suspension to a final probe concentration of 0.2  $\mu$ M. Fluorescence emission spectra were measured by using an ISS PCI spectrofluorometer. The excitation wavelength was 531 nm, and the emission intensities were measured at 560 and 580 nm. The staining curves (i.e., the dependence of the emission intensity ratio,  $I_{580}/I_{560}$ , on the duration of staining,  $t$ ) were fitted as described previously (26), and the value of the intensity ratio at equilibrium was estimated.

**Immunodetection of Pma1 and Trk1.** In order to estimate the relative amounts of Trk1 and Pma1 present in the plasma membrane, each mutant strain was transformed with a plasmid harboring a hemagglutinin (HA) epitope-tagged version of Trk1 described previously (50). Cells were grown to the mid-log phase ( $0.5 \times 10^7$  cells per ml) in selective minimal growth medium. Cells were collected

TABLE 1. Functional groups enriched in our screen

Category and function ( <i>P</i> value) <sup>a</sup>	Genes
Protein fate (folding, modification, and destination) (9.9E−12)	
Modification by phosphorylation, dephosphorylation, and autophosphorylation (3.71E−6)	
Protein kinases.....	<i>SAT4/HAL4, HAL5, PTK2, SKY1, HRK1, PHO85, RTK1</i>
Protein phosphatases.....	<i>PTC1, SIT4, SAP185, SAP155, PPZ1, YVH1, REG1, RTS1</i>
Cellular transport, transport facilities, and transport routes (3.7E−09)	
Vesicular transport (Golgi network, etc.) (2.27E−16)	
TRAPP complex.....	<i>KRE11, GSG1</i>
GARP complex.....	<i>VPS52, VPS54, VPS51</i>
Membrane-associated retromer complex.....	<i>VPS29, VPS35, PEP8</i>
CORVET and HOPS complexes.....	<i>PEP3, PEP5, VPS16, VAM6, VPS41</i>
SNARE proteins.....	<i>VAM7, SEC22, GOS1, TLG2, PEP12, VAM3</i>
Oligomeric Golgi complex.....	<i>COG7, COG8, COG6, COG5, RUD3, SNC2</i>
Other proteins related to the Golgi network.....	<i>VPS15, VPS34, ARL1, ARF1, SYS1, YPT6, GCS1, ERV14, LST7, VPS1</i>
Cell cycle and DNA processing (3.0E−07)	
DNA conformation modification (e.g., chromatin) (1.5E−05)	
ADA/SAGA/SLIK remodeling complex.....	<i>GCN5, SPT7, HFI1, SPT20, SGF29, ADA2, NGG1, SGF11, UBP8, DST1</i>
SWR complex.....	<i>ARP6, SWC5, SWC3, VPS71, HTZ1, VPS72</i>
RSC chromatin-remodeling complex.....	<i>NPL6, HTL1, RSC1, RSC2, LDB7</i>
Transcription (3.4E−03)	
Transcriptional control (2.2E−03)	
RNA polymerase II mediator complex.....	<i>SRB5, MED2, SOH1, MED1, CSE2</i>
Other RNA polymerase II-associated proteins.....	<i>PAF1, RTF1, RPB9, HPR1, RPB4</i>
Transcription cofactors and related proteins.....	<i>SWI6, THP1, TAF14, SWI3</i>
Phosphorylation of the RNA polymerase II C-terminal domain.....	<i>CTK2, SSN3</i>

<sup>a</sup> The *P* value reflects the probability that the observed annotation of the particular GO term to a group of genes occurs by chance.

by centrifugation, processed, and analyzed by immunoblotting to detect the epitope-tagged version of Trk1 and endogenous Pma1 as described previously (34).

**Other techniques.** For the determination of *ENAI* expression, wild-type and mutant strains were transformed with plasmid pKC201, which carries the *ENAI* promoter fused to the *lacZ* gene. Cells were grown in YPD medium and processed for  $\beta$ -galactosidase activity measurements essentially as described previously (46). The distribution of Trk1 in cells grown to mid-log phase ( $0.5 \times 10^7$  cells per ml) in selective minimal growth medium was monitored by confocal microscopy, as described previously (34).

## RESULTS

**Genomewide mutant screen for changes in tolerance to the toxic cations hygromycin B, spermine, and TMA.** The haploid mutant library in the BY4741 background (~4,900 clones) was analyzed for changes in tolerance to the toxic cations hygromycin B, spermine, and TMA in comparison to wild-type cells. The initial screen produced 1,174 strains with an altered hygromycin B tolerance (944 more sensitive and 230 hypertolerant), 707 mutants with an abnormal tolerance to spermine (338 sensitive and 369 more tolerant), and 1,935 strains with an anomalous tolerance to TMA (1,610 hypersensitive and 325 with increased tolerance). We concentrated on those mutants that exhibited either hypersensitivity or hypertolerance to all three compounds as possible candidates for an altered electrochemical gradient. The putative positive mutants were retested at 5 different concentrations of each toxic compound to confirm and score the phenotype intensity. To this end, a scale from 1 (most sensitive) to 10 (most tolerant) was defined, where the score for the wild-type strain was 6. At the end of the

analysis a final list of 226 mutants with a triple phenotype (202 hypersensitive and 24 hypertolerant) was assembled (see Table S1 in the supplemental material). Because potassium influx is a major consumer of the electrochemical gradient (25), we considered the possibility that some mutations may exhibit growth problems at limiting potassium concentrations. Therefore, all 226 mutants were tested for growth in Translucent medium containing 1 mM K<sup>+</sup> in comparison with the same medium containing 50 mM K<sup>+</sup>. Under these conditions the low/high-K<sup>+</sup> growth ratio is about 70% for the wild-type strain (Table S1). In agreement with our hypothesis, 60 mutants showed substantial growth impairment at limiting potassium concentrations (1 mM/50 mM K<sup>+</sup> growth ratio equal to or lower than 35%), while 63 strains displayed a moderate growth defect (growth ratio between 35% and 50%). Therefore, more than 50% of the mutants identified in the screen had altered potassium requirements.

To establish possible functional relationships between the genes whose mutations were responsible for the observed phenotypes, we performed a Gene Ontology analysis. As shown in Table 1, mutants in several cellular processes were enriched in our collection. These mutants included a substantial number of genes encoding protein kinases and protein phosphatases (both catalytic and regulatory subunits) and many genes involved in intracellular trafficking (Golgi compartment, endosome, and vacuolar transport), chromatin modification, and the regulation of transcription. Our screen identified most mutations in genes encoding proteins already known to affect the electrochemical gradient, such as the high-affinity potas-



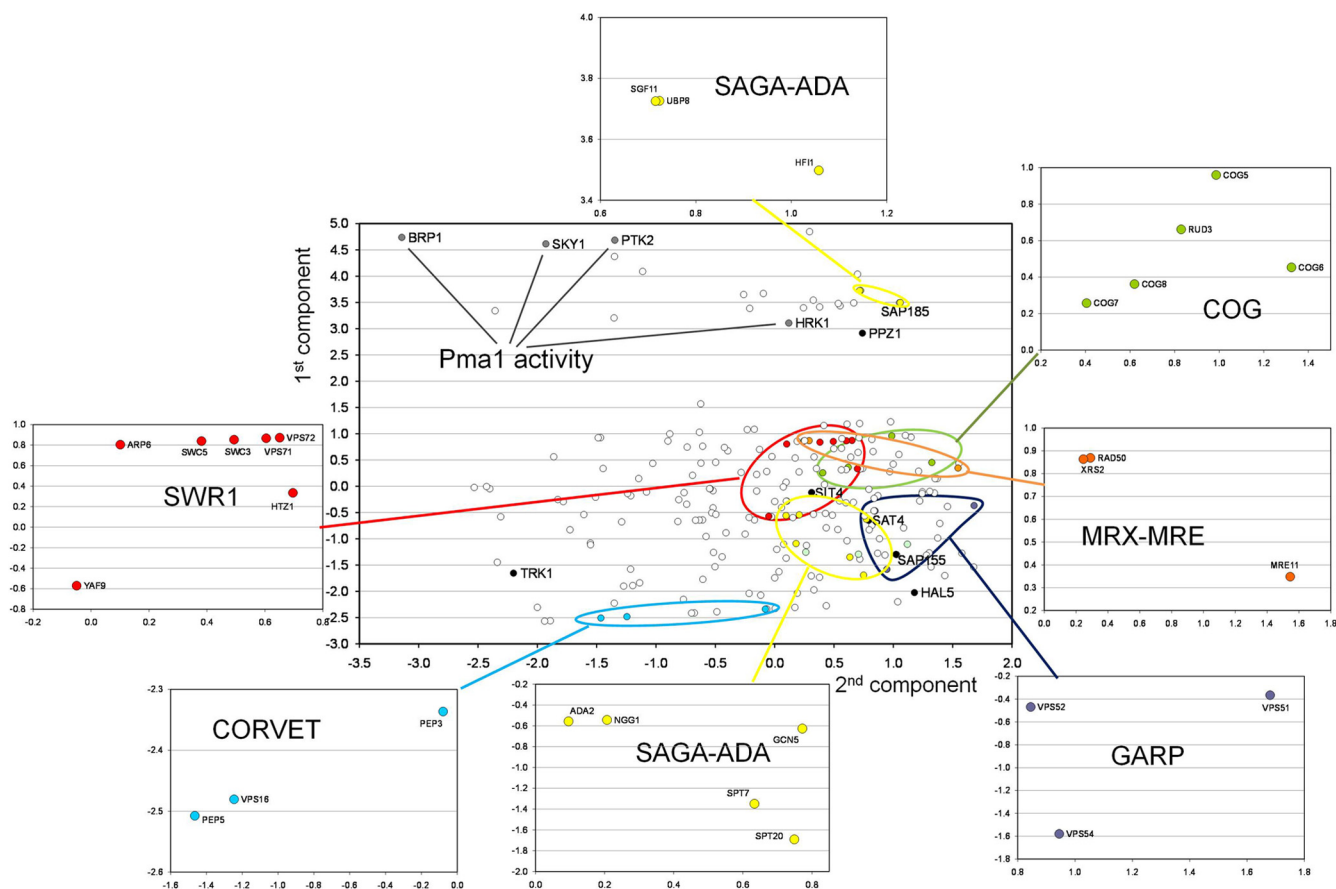


FIG. 1. Principal component analysis (PCA) of the drug sensitivity and potassium requirements of the mutants identified in the screen. The positions of specific genes discussed in the main text are also shown in the main graph. Colors denote functional families whose members can be identified in the expansions.

sium transporter *Trk1*; the protein kinase *Ptk2*, which has been proposed to activate the *Pma1* proton ATPase; or the protein phosphatase *Ppz1*, which regulates alkaline cation efflux through the *Ena1* ATPase and potassium influx through *Trk1*. Therefore, the approach appeared to be reliable, consistent, and likely to produce novel findings.

We then carried out a principal component analysis (PCA) in which the first component was a combination of the scores for tolerance to the three drugs and the second component was related to the capacity to grow at limiting potassium concentrations. The results are shown in Fig. 1. We observed that diverse gene mutations clustered together, which is indicative of their functional relationship. For instance, among the triple-sensitive mutants, we identified several members of the conserved oligomeric Golgi (COG) complex, a cytosolic tethering complex that functions to mediate the fusion of transport vesicles to Golgi compartments. Similarly, we recovered three members of the GARP (Golgi-associated retrograde protein) complex, which is required for the recycling of proteins from endosomes to the late Golgi compartment. We also observed a clustering of genes belonging to the SWR complex (*ARP6*, *SWC5*, *SWC3*, *VPS71/SWC6*, and *VPS72/SWC2*), required for the ATP-dependent exchange of nucleosomal histone H2A for the minor H2AZ variant, as well as the H2AZ gene itself (*HTZ1*). Interestingly, while all these mutants displayed di-

verse degrees of hypersensitivity to all three drugs, they exhibited little or no growth defect at limiting (1 mM) potassium concentrations. In contrast, mutants in members of the CORVET (class C core vacuole/endosome tethering) complex, such as *PEP5*, *VPS16*, and *PEP3*, were highly sensitive to the drugs and grew quite poorly when the potassium concentration was limiting. A remarkable situation was observed when components of the SAGA (*Spt-Ada-Gcn5*-acetyltransferase) acetylation complex were considered. This group includes not only the *GCN5* histone acetyltransferase (the catalytic subunit of the ADA and SAGA complexes) but also diverse members of the complexes (*ADA2*, *NGG1/ADA3*, *SPT7*, and *SPT20*), whose mutations conferred a marked sensitivity phenotype to all three drugs and moderate growth defects at low potassium concentrations, as well as examples of hypertolerant mutants with no defect at limiting potassium concentrations, such as *UBP8*, *SGF11*, and *HFI1/ADA1*. It is worth noting that whereas the phenotypes of the *ubp8* and *sgf11* mutants appear to be consistent (*Ubp8* is a ubiquitin-specific protease required for the SAGA-mediated deubiquitination of histone H2B, and *Sgf11* is required for the *Ubp8p* association with SAGA), the phenotype of the *hfi1/ada1* strain is surprising, since this mutant was reported previously to have phenotypes similar to those of *spt20* and *spt7* (49).

To gain further insight into the molecular basis for the ob-

TABLE 2. Relevant parameters for selected mutants<sup>a</sup>

Group and mutation	Sensitivity score			% growth at 1 mM K <sup>+</sup>	Acidification rate (% vs WT)	Protein score		% Rb <sup>+</sup> uptake		Membrane potential (% vs WT)
	HYG	SPERM	TMA			Trk1	Pma1	50 mM Rb <sup>+</sup>	0.5 mM Rb <sup>+</sup>	
WT	6	6	6	70.0	100.0	5	5	100.0	100.0	100.0
<b>A</b>										
<i>TRK1</i>	1	1	4	4.7	79.4	5	5	ND	0.0	118.4
<i>VAM7</i>	3	4	5	2.6	95.3	4	5	96.4	98.0	133.8
<i>VAM3</i>	4	4	4	4.5	95.5	4	4	107.1	103.9	136.3
<i>AFG3</i>	1	3	3	3.0	80.8	4	4	135.7	7.8	139.0
<i>ERG6</i>	1	1	1	7.0	99.9	4	4	39.3	47.1	208.3
<i>LST7</i>	3	4	4	13.8	109.8	5	5	107.1	ND	122.5
<i>PEP5</i>	1	1	1	15.0	111.7	1	4	92.9	100.0	223.4
<i>AKR1</i>	1	2	1	17.6	111.8	(*) <sup>b</sup>	(*)	32.1	41.2	157.3
<i>REG1</i>	1	1	3	30.9	95.1	7	4	78.6	82.4	92.2
<i>PIG1</i>	5	4	5	33.7	120.8	7	4	53.6	ND	101.3
<i>VPS16</i>	1	1	1	18.7	94.6	1	2	96.4	98.0	100.5
<i>VPS15</i>	2	1	4	21.6	70.9	1	2	78.6	60.8	102.0
<b>B</b>										
<i>RIC1</i>	3	3	1	60.7	92.4	3	5	53.6	78.4	151.0
<i>SNC2</i>	2	2	2	63.1	81.9	5	5	53.6	ND	103.2
<i>VID22</i>	1	1	3	63.4	94.8	5	5	107.1	100.0	111.8
<i>NHX1</i>	1	4	5	65.5	87.7	5	5	96.4	ND	122.0
<i>RTS1</i>	3	2	3	66.1	114.0	5	5	164.3	102.0	107.4
<i>COG6</i>	3	4	5	67.7	107.0	5	5	78.6	ND	145.0
<i>TLG2</i>	1	2	2	69.4	105.6	4	5	96.4	ND	141.5
<i>VPS54</i>	1	1	3	57.1	97.4	4	5	75.0	ND	156.9
<b>C</b>										
<i>BRP1</i>	9	10	10	2.2	79.4	5	1	25.0	ND	96.1
<i>SKY1</i>	8	10	10	22.3	63.3	5	5	78.6	82.4	112.1
<i>PTK2</i>	8	10	10	32.1	57.0	7	4	25.0	ND	108.5
<i>SUR2</i>	8	8	8	47.7	101.4	5	4	75.0	72.5	76.3
<b>D</b>										
<i>HRK1</i>	7	8	7	53.0	95.4	5	3	78.6	98.0	107.3
<i>SGF11</i>	8	9	7	64.1	95.5	5	5	53.6	82.4	100.5
<i>SAP185</i>	7	9	7	69.4	92.4	5	5	39.3	ND	99.8

<sup>a</sup> Sensitivity to hygromycin (HYG), spermine (SPERM), and TMA ranged from 1 (highly sensitive) to 10 (highly tolerant). The wild type (WT) received a score of 6. Growth at 1 mM K<sup>+</sup> was calculated as the ratio of growth at 1 mM/growth at 50 mM KCl (the wild-type ratio was 70.0). The acidification rate for the wild-type strain was 0.362 ± 0.037 μmol/min · mg (wet weight). Rubidium uptake rates for the wild type were 2.8 ± 0.1 and 5.8 ± 0.2 nmol/min · mg (wet weight) at 50 mM and 0.5 mM rubidium, respectively. The membrane potential for the wild-type strain was 1.54 (I<sub>580</sub>/I<sub>560</sub>). The amounts of Trk1 and Pma1 were evaluated by immunoblotting and scored (a score <5 indicates lower-than-normal amounts and a score of >5 denotes increased protein levels at the membrane fraction). ND, not determined.

<sup>b</sup> The asterisk denotes that the amounts of Trk1 and Pma1 could not be precisely evaluated in this mutant due to inconsistent protein recovery from the insoluble fraction.

served phenotypes identified in the screens, we separated the mutants into four different categories. We first separated the tolerant and sensitive mutants, and we then split the mutants in each category into groups based on their growth in medium with a low potassium concentration. Therefore, group A represents sensitive mutants with defects in growth in medium with a low potassium concentration. Group B mutants are sensitive to the three tested cations but grew nearly as well as the wild-type control in low-potassium medium. The tolerant mutants were similarly divided into group C (poor growth in medium with a low potassium concentration) and group D (no defect in medium with a low potassium concentration). We then chose representatives from each category for further analysis and confirmed their phenotypes by creating these mutations *de novo* in the BY4742 (*MATα his3Δ leu2Δ lys2Δ ura3Δ*) and, in some cases, in the DBY746 (*MATα ura3-52 leu2-3 leu2-112 his3-Δ1 trp1-289*) backgrounds. Among the 29 mutants selected from the deletion library, we found that the

deletion of the *RCK2* and *RCY1* genes in the above-mentioned backgrounds did not reproduce the observed phenotypes, so they were not included in further analyses. Table 2 shows the mutants for which we investigated a number of parameters in order to begin to elucidate the molecular basis for these phenotypes. These parameters were related to potassium homeostasis (rubidium uptake and the presence of Trk1 in plasma membrane fractions), proton pumping (measured as the acidification of the medium and the presence of Pma1 in plasma membrane fractions), as well as *ENAI* ATPase expression.

All clones were investigated by Western analysis to determine the levels of both Trk1 and Pma1 in plasma-membrane-containing fractions. As shown in Table 2 and Fig. S1A to S1C in the supplemental material, the group A *pep5*, *vps15*, and *vps16* mutants showed markedly decreased levels of epitope-tagged Trk1 expressed from a centromeric plasmid. Interestingly, another mutant (*akr1*, encoding palmitoyl transferase) showed decreased levels of both Trk1 and Pma1. Although

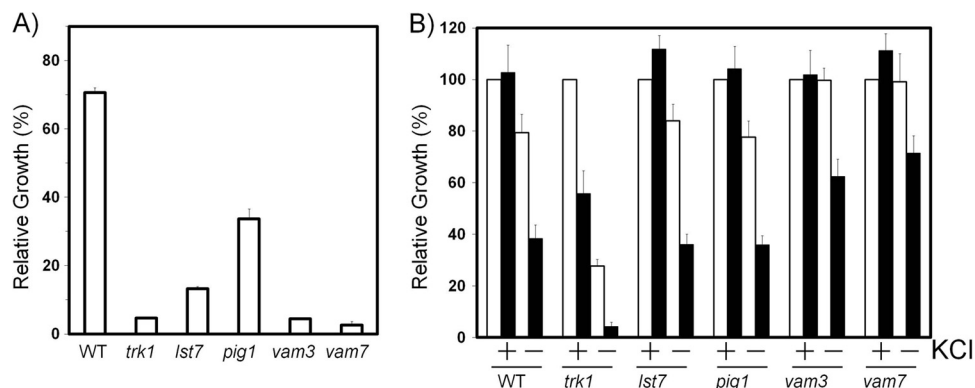


FIG. 2. Effects of ammonia and low potassium concentrations on the growth of *trk1*, *lst7*, *pig1*, *vam3*, and *vam7* mutants. (A) Exponentially growing cultures of each strain were diluted to an  $OD_{600}$  of 0.004 in Translucent medium supplemented with 50 mM or 1 mM KCl and incubated at 28°C for 16 h. Final  $OD_{600}$  values were measured, and growth percentage values were calculated relative to the growth of each mutant in 50 mM KCl. (B) Growth of the same strains in arginine-phosphate medium supplemented with 50 mM KCl (+) or 1 mM KCl (-) and with (closed bars) or without (open bars) ammonium sulfate (30 mM). Exponentially growing cultures of each strain were diluted to an  $OD_{600}$  of 0.008 in arginine phosphate medium supplemented as indicated and incubated at 28°C for 16 h. Growth percentage values are relative to the growth of each mutant in 50 mM KCl without ammonium sulfate.

further experiments showed that the interpretation of the observed decrease in the amount of Pma1 and Trk1 was impeded due to difficulties in protein recovery from the insoluble fraction, *akr1* likely presents lower levels of Trk1 in the insoluble fraction (see Fig. S1D in supplemental material). In fact, this mutant displayed a relative increase in Pma1 activity, as determined by the proton pumping assay; grows poorly in low-potassium medium; and shows defects in low-affinity  $Rb^+$  uptake ( $0.9 \pm 0.1$  nmol/mg  $\cdot$  min, compared to the wild-type strain, at  $2.8 \pm 0.1$  nmol/mg  $\cdot$  min), suggesting that this protein may be important to establish and/or maintain Trk1 in an active state in the plasma membrane. Future experiments will be aimed at elucidating the molecular mechanisms involved. Significant differences in Pma1 accumulation were observed only for the *brp1* mutant, which is a *PMA1* promoter deletion (35). These results identified components of the intracellular trafficking machinery (*pep5*, *vps15*, and *vps16*) as being important for Trk1 delivery to and/or stability in the plasma membrane.

Interestingly, the majority of the selected mutants did not present important differences in the levels of either Trk1 or Pma1. Thus, we went on to investigate the activities of these two proteins. As a first step, we measured low-affinity rubidium uptake as an indication of Trk1 activity (Table 2). As expected, most group A mutants (sensitive to all three compounds and presenting a growth defect in low-potassium medium) showed a reduction in  $Rb^+$  uptake. However, there are several interesting exceptions. For instance, the *lst7* mutant, lacking a protein required for the transport of the nitrogen-regulated amino acid permease Gap1 from the Golgi compartment to the cell membrane, exhibited quite poor growth in Translucent medium containing 1 mM  $K^+$  but did not display obvious defects in Trk1 or Pma1 membrane localization or  $Rb^+$  uptake (Table 2). We observed that this mutant grew similarly to the wild-type strain in arginine-phosphate medium (which does not contain ammonium) in the presence of 1 mM KCl. However, the addition of 30 mM ammonium sulfate resulted in a marked growth defect similar to that observed for the wild-type strain

in the same medium. It must be noted that a previous report using a chemostat model described that ammonium becomes toxic for yeast cells growing under conditions of potassium limitation (20). Therefore, it can be hypothesized that this phenotype observed for the *lst7* mutant cells is related to a toxic effect of ammonium, which is detectable only at low potassium concentrations.

Vam3 and Vam7 are syntaxin and SNAP-25 homologs, respectively, that work in a SNARE complex implicated in vacuolar protein sorting. Both mutants exhibit a plasma membrane potential slightly higher than that of the wild-type strain, which may contribute to their sensitivity to the three toxic cations, but they grow very poorly in low-potassium media despite normal Trk1 protein levels and  $Rb^+$  transport. Similar to *lst7* strain, ammonium seems to exert a toxic effect on *vam3* and *vam7* mutants but less intense than that observed for the *lst7* mutant (Fig. 2).

Although not quantitatively overrepresented in the screen, we recovered four mutants (*erg6*, *erg2*, *erg3*, and *erg5*) corresponding to the last steps in biosynthesis of ergosterol. We selected *erg6*, lacking a  $\Delta(24)$ -sterol C-methyltransferase, for further analysis. The *erg6* mutant grew very poorly in low-potassium medium and presented a significant defect in  $Rb^+$  uptake (approximately a 70% reduction) and a marked increase in membrane potential. Therefore, we tested other mutants of the ergosterol synthesis pathway. As shown in Fig. 3, the *erg28* strain showed wild-type-like phenotypes for drugs and a moderate sensitivity to low potassium concentrations. In contrast, *erg2* displayed a strong sensitivity to drugs and poor growth at low potassium concentrations. These defects were less dramatic for mutants in the next two steps, *erg3* and *erg5*. The determination of high-affinity  $Rb^+$  uptake showed decreased values for all mutants, particularly in the case of *erg6* (data not shown).

Curiously, *erg4*, the mutant in the last step of the pathway, was highly sensitive to hygromycin B and TMA but moderately tolerant to spermine and exhibited a moderate growth defect at limiting potassium concentrations. Most of these mutants

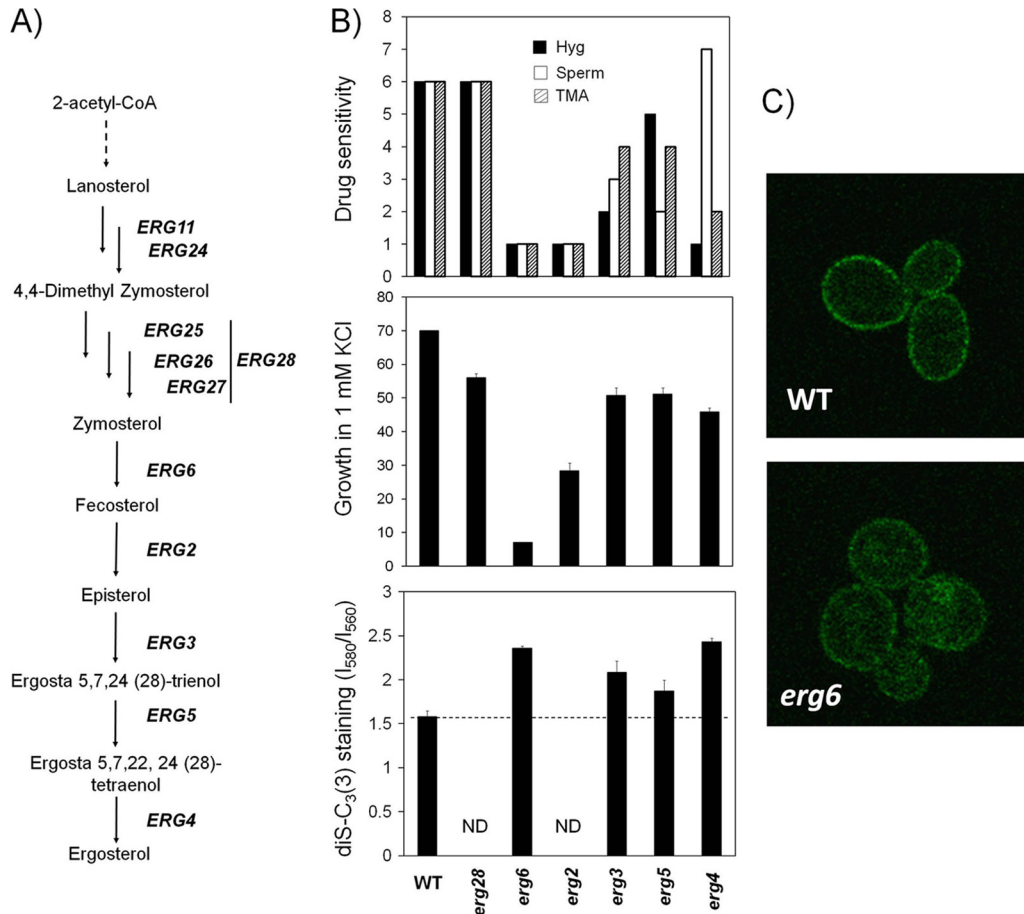


FIG. 3. Characterization of *erg* mutants for K<sup>+</sup> homeostasis-associated attributes. (A) The last steps in the ergosterol biosynthetic pathway from acetyl coenzyme A (CoA) to ergosterol. (B, top) Phenotypes for drug sensitivity. The scale is described in the text. (Middle) Growth in limiting-potassium (1 mM) medium, expressed as a percentage for the 1 mM/50 mM KCl ratio. (Bottom) Estimation of relative membrane potential values for the indicated mutants. ND, not determined. For the middle and bottom panels, data are means ± standard deviations (SD) of data from 3 to 4 independent experiments. (C) Confocal microscopy analysis of the Trk1-GFP distribution in wild-type and *erg6* cells.

exhibited higher levels of staining with the potentiometric probe, which might reflect a hyperpolarized plasma membrane relating quite well to their sensitivity to drugs.

In the case of the group B mutants, these strains were all sensitive to the three compounds tested but showed no growth defect in low-potassium medium, and they expressed near-normal levels of Pma1 or Trk1. In accordance with the observed sensitivity phenotypes, these mutants displayed various degrees of increased membrane potential (Table 2). Seven of the eight mutants are involved in different aspects of vesicle trafficking, thus suggesting that this cellular process is important for the establishment and maintenance of membrane potential through Pma1/Trk1-independent mechanisms. We considered the possibility that some of these mutants, particularly those exhibiting a higher-than-normal plasma membrane potential, may suffer a deregulation of the expression of the *ENA1* Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase. Therefore, we tested the expression of the activity of the *ENA1* promoter by using a reporter plasmid carrying a translational fusion of the promoter to the *lacZ* gene (Fig. 4). Interestingly, mutants with high plasma membrane potential, such as *ric1*, *cog6*, *tlg2*, or *vps54* mutant, also exhibited an expression level from the *ENA1* promoter

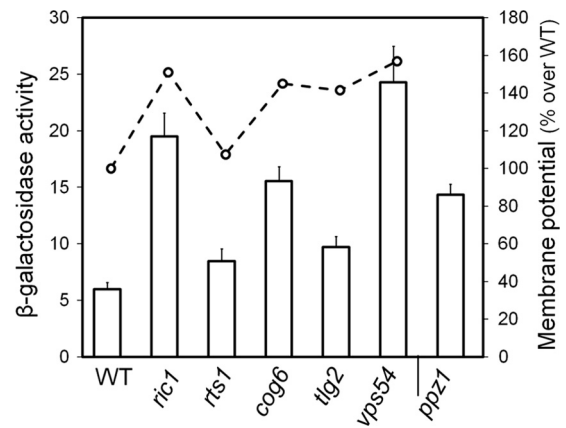


FIG. 4. Activity of the *ENA1* promoter and relative plasma membrane potential in selected members of group B mutants. The β-galactosidase activity was measured as indicated in Materials and Methods, and data are the means ± standard errors of the means (SEM) of data from five independent experiments performed in triplicate. Plasma membrane potential values, generated from at least three independent experiments, are expressed as a percentage relative to the wild-type value, which was set as 100%.



clearly higher than that of the wild-type strain, roughly in the same range as that of the *ppz1* mutant, which has been known for years to have abnormally increased basal *ENAI* expression levels (36, 42). However, although it is tempting to speculate that the increased membrane potential is the result of exacerbated *ENAI* activity, additional studies will be required to establish the potential link between both phenotypes.

Interestingly, we observed marked decreases in  $\text{Rb}^+$  uptake in three group C and D mutants: the *brp1*, *ptk2*, and *sap185* mutants. Both the *brp1* and *ptk2* mutants have reduced Pma1 activity (and expression, in the case of *brp1*). This reduction in Pma1 activity, which is known to be required for Trk1 function, is likely to explain these results and would also reduce the relative accumulation of these toxic cations. The case of *sap185* is quite interesting and may be related to its function in Nha1 regulation (Fig. 1 and Table 2, and see Discussion). Sky1 was previously suggested to be involved in salt tolerance and plasma membrane potential through the regulation of Trk1 (13), and the mutant is also hypertolerant to diverse polyamines (8). In agreement with that study, we observed that the *sky1* mutant was resistant to all three toxic cations tested here.

The fourth group C mutant, *sur2* (encoding a sphinganine  $\text{C}_4$ -hydroxylase involved in sphingolipid biosynthesis), did not show defects in Pma1 activity but displayed a significant decrease in membrane potential. This decrease in the plasma membrane potential would explain the observed tolerance phenotypes and suggests that this mutant affects the activities of proteins other than Pma1 and Trk1, which are important for the determination of plasma membrane potential.

## DISCUSSION

We have performed a screen of the haploid deletion library for changes in tolerance to three drugs that, having different toxicity mechanisms, share the characteristic of being cations at the pH of standard growth media. The output for this screen has been the identification of 226 mutants with altered tolerance, most of which are hypersensitive strains. Our results show substantial differences from data from previous multidrug deletion screens. For instance, Hillenmeyer and coworkers (21) analyzed the homozygous diploid mutant collection for hypersensitivity to 178 different drugs (including hygromycin B but not spermine or TMA). It is worth noting that our screen has uncovered far more hygromycin B-sensitive mutants than the above-mentioned work. The difference can be attributed to the distinct experimental approaches used and the fact that we used higher concentrations of hygromycin B in our screen. The report by Hillenmeyer and coworkers defined a list of 510 multidrug resistance (MDR) genes. Interestingly, only 57 of our mutants are included in this list, and among them, 8 are hypertolerant to all three drugs. In addition, we did not find multidrug efflux transporters, such as *PDR5*, *SNQ2*, *PDR10*, or functionally related genes. This suggests that most of our findings do not reflect a general drug toxicity effect, but instead, we have selected for a more specific subset of genes. A functional survey of the coincident genes reveals that this subset is largely enriched in vesicular transport (5.7E–17), which is in agreement with the notion that intracellular traffic is a key function for multidrug tolerance (21, 48). In contrast, the list of noncoincident genes is enriched in DNA modification and transcrip-

tion as well as protein fate and modification (mainly protein phospho-dephosphorylation) activities. As far as DNA modification and transcription are concerned, components of the SAGA and ADA complexes have been identified as being important for drug tolerance, as these complexes are involved in both the positive and negative transcriptional regulation of numerous genes, particularly under conditions of cellular stress. Different subunits of SAGA have been genetically and biochemically defined, and usually, the mutation of its components (when viable) results in sensitivity to drugs. However, although we observed that the mutations affecting Gcn5/Ada2/Ngg1 (histone acetyltransferase module) do result in drug sensitivity, mutations affecting the deubiquitination module (22), such as that of *UBP8*, the ubiquitin-specific protease required for the SAGA-mediated deubiquitination of histone H2B, and that of *SGF11*, required for the Ubp8 association with SAGA, are similarly tolerant (Fig. 1). The *sus1* mutant, lacking the third component of the module, was absent in our library.

The identification of several protein kinases and phosphatases in our screen suggests that diverse signaling pathways are key elements in tolerance to cationic drugs. An interesting example is the Sky kinase. *SKY1* was considered an MDR gene in the study mentioned above (21). However, we observed a marked tolerance to all three drugs, accompanied by a significant defect in growth in low-potassium medium, a slight defect in low-affinity  $\text{Rb}^+$  uptake, and a pronounced decrease in the proton-pumping activity. Thus, although previous reports suggested a Trk1-dependent role for Sky1 in salt tolerance and plasma membrane potential (13) and that the deletion or overexpression of *SKY1* does not significantly affect Pma1 activity (9), our results suggest that, at least in this genetic background, the tolerance of the *sky1* mutant could be due primarily to a decrease in Pma1 activity. Sky1 was found to phosphorylate Npl3, an RNA-binding protein that carries poly(A)<sup>+</sup> mRNA from the nucleus into the cytoplasm. The phosphorylation of Npl3p by the cytoplasmically localized Sky1 is required for the efficient release of mRNA upon the termination of export, and this phosphorylation-and-dephosphorylation cycle allows Npl3 to disengage from the mRNA and shuttle back into the nuclear compartment (16). Interestingly, we have found a drug-hypersensitive phenotype for the *npl3* mutant (see Table S1 in the supplemental material). Therefore, it is tempting to speculate that an alteration in mRNA export is the underlying cause for the observed drug tolerance. Another example of the likely involvement of protein kinases in the maintenance of the electrochemical gradient is revealed by the evaluation of the *akr1* mutation. Akr1 is known to palmitoylate the type 1 casein kinases Yck1 and Yck2, an event required for kinase localization to the plasma membrane (11). Yck1 and Yck2 were shown previously to phosphorylate and inhibit the Pma1  $\text{H}^+$ -ATPase (10). Therefore, it is conceivable that the lack of Akr1 could result in increased Pma1 activity, in agreement with our proton-pumping activity data. This increased Pma1 activity would justify, at least in part, the drug sensitivity of this mutant. However, it would not explain the impaired rubidium transport and the observed incapacity to grow in low- $\text{K}^+$  medium. However, Yck kinases are known to modulate the activity and/or turnover of several membrane transporters, such as the maltose permease (15) and the monocarboxylate transporter Jen1 (15). It is tempting to speculate that the Trk1 potassium trans-

porter could also be affected in this mutant, and this hypothesis is supported by our analysis of the amount of Trk1 present in plasma membrane-enriched fractions (see Fig. S1D in the supplemental material). Unfortunately, as mentioned above, the quantification of membrane proteins in this strain is not a straightforward task.

It is known that the mutation of *sap185* involves the inhibition of the Nha1 Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter (28), which would reduce the potassium loss. This would imply reduced potassium uptake requirements and may explain the decreased rubidium influx observed for this mutant. This mutant is likely to contain higher-than-normal intracellular potassium levels, as documented previously for the *nha1* mutant (1), which would explain its normal growth at limiting potassium concentrations and its moderate hypertolerance to the drugs. On the contrary, we observed that a *sap155* mutant, which has an activated Nha1 antiporter (28), is hypersensitive to the drugs and presents a moderate growth defect at limiting potassium concentrations. Since the acidification rate in this mutant is normal (not shown), increased potassium efflux could augment the electrochemical gradient, thus explaining the hypersensitive phenotype.

Ergosterol is one of the principal components of the plasma membrane in yeast, and its synthesis, specifically the function of Erg4 and Erg6, has been shown to be important for the delivery of proteins to the plasma membrane (37). For instance, the inhibition of ergosterol synthesis or the mutation of *erg6* or *erg2* promotes the abnormal sorting of the tryptophan permease Tat2 to the plasma membrane (4, 5). However, at least in the case of *erg6*, although we observed a significant decrease in potassium uptake, which likely explains the growth defect in low-potassium medium, the amount of Trk1 at the plasma membrane was not drastically reduced. In this regard, it was reported previously that the heterologously expressed hexose-H<sup>+</sup> symporter Hup1, although present in the cell membrane when expressed in an *erg6* mutant, showed significantly decreased catalytic activity (18). Therefore, one might speculate that, even if properly delivered to the membrane, the *ERG6* mutation could affect the activity of the Trk1 transporter. In fact, Trk1 was shown previously to be associated with plasma membrane "rafts" (50), a kind of structure that, in many cases, depends on proper sterol biosynthesis (27). Accordingly, the pattern of fluorescence of Trk1-green fluorescent protein (GFP) is notably altered in this mutant, thus providing support for this hypothesis (Fig. 3C). In addition, a very recent report described that the treatment of wild-type cells with antifungals presumed to block sterol biosynthesis results in increased potassium efflux (2). Those authors also detected an increase in the plasma membrane potential, similar to what we found for our *erg* mutants. Although we have not determined the potassium efflux in these mutants, it is conceivable that this effect may contribute to the plasma membrane hyperpolarization described here.

In conclusion, our screen has identified a substantial number of genes which were not previously described to play a direct or indirect role in potassium homeostasis. For a number of cases, it is possible, in the context of our current knowledge, to provide an explanation for the observed phenotypes. Thus, it appears that most mutants belonging to group A may suffer a defect in Trk1 function, whereas the phenotypes of group B

strains would be independent of Trk1 and Pma1. In contrast, decreased levels of Pma1 expression or activity, which could indirectly affect Trk1 function, may explain the behavior of group C mutants. Finally, the basis for group D phenotypes is not obvious, although it may involve, at least in some cases, a modulation of Nha1 activity. We stress that our screen has revealed coherent phenotypes in many cases for different mutations affecting a given function. For instance, among the mutations conferring drug sensitivity, we have identified not only *YPT6*, which encodes a GTPase involved in the secretory pathway required for the fusion of endosome-derived vesicles with the late Golgi compartment, but also *RGPI* and *RIC1*, encoding the exchange factor that catalyzes nucleotide exchange on Ypt6; *SYS1*, which encodes a multicopy suppressor of the *ypt6* null mutation; and even *VPS63*, a dubious open reading frame, which overlaps with *YPT6*. Therefore, we are confident that further exploration of the data generated in this work will lead to the identification of functional associations currently unknown.

#### ACKNOWLEDGMENTS

We thank all members of the Translucent Consortium (<http://www.translucent-network.org/index.php>) for stimulating discussions.

This work was supported by grants BFU2008-04188-C03-01, GEN2006-27748-C2-1-E/SYS (SysMo ERA-NET), and EUI2009-04147 (SysMo2 ERA-NET) to J.A.; GEN2006-27748-C2-2-E/SYS (SysMo ERA-NET) and BFU2008-04188-C03-03 to J.R.; and BFU2008-04188-C03-03 to L.Y. (Ministry of Science and Innovation, Spain, and FEDER). Work in the laboratory of the Institute of Physiology in Prague was supported by grants MSMT LC531, GA AS CR IAA500110801, and AV0Z 50110509. J.A. was the recipient of an Ajut 2009SGR-1091 and an ICREA academia award (Generalitat de Catalunya).

#### REFERENCES

- Banuelos, M. A., et al. 2002. Role of the Nha1 antiporter in regulating K(+) influx in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **19**:9-15.
- Calahorra, M., C. Lozano, N. S. Sanchez, and A. Pena. 2011. Ketoconazole and miconazole alter potassium homeostasis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim. Biophys. Acta* **1808**:433-445.
- Casado, C., et al. 2010. Regulation of Trk-dependent potassium transport by the calcineurin pathway involves the Hal5 kinase. *FEBS Lett.* **584**:2415-2420.
- Daicho, K., et al. 2009. Sorting defects of the tryptophan permease Tat2 in an *erg2* yeast mutant. *FEMS Microbiol. Lett.* **298**:218-227.
- Daicho, K., et al. 2007. The ergosterol biosynthesis inhibitor zaragozic acid promotes vacuolar degradation of the tryptophan permease Tat2p in yeast. *Biochim. Biophys. Acta* **1768**:1681-1690.
- de Nadal, E., et al. 1998. The yeast halotolerance determinant Hal3p is an inhibitory subunit of the Ppz1p Ser/Thr protein phosphatase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**:7357-7362.
- Eraso, P., M. J. Mazon, and F. Portillo. 2006. Yeast protein kinase Ptk2 localizes at the plasma membrane and phosphorylates in vitro the C-terminal peptide of the H<sup>+</sup>-ATPase. *Biochim. Biophys. Acta* **1758**:164-170.
- Erez, O., and C. Kahana. 2001. Screening for modulators of spermine tolerance identifies Sky1, the SR protein kinase of *Saccharomyces cerevisiae*, as a regulator of polyamine transport and ion homeostasis. *Mol. Cell. Biol.* **21**:175-184.
- Erez, O., and C. Kahana. 2002. Deletions of SKY1 or PTK2 in the *Saccharomyces cerevisiae* *trk1Δ* mutant cells exert dual effect on ion homeostasis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **295**:1142-1149.
- Estrada, E., et al. 1996. Phosphorylation of yeast plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase by casein kinase I. *J. Biol. Chem.* **271**:32064-32072.
- Feng, Y., and N. G. Davis. 2000. Akr1p and the type I casein kinases act prior to the ubiquitination step of yeast endocytosis: Akr1p is required for kinase localization to the plasma membrane. *Mol. Cell. Biol.* **20**:5350-5359.
- Ferrando, A., S. J. Kron, G. Rios, G. R. Fink, and R. Serrano. 1995. Regulation of cation transport in *Saccharomyces cerevisiae* by the salt tolerance gene HAL3. *Mol. Cell. Biol.* **15**:5470-5481.
- Forment, J., J. M. Mulet, O. Vicente, and R. Serrano. 2002. The yeast SR protein kinase Sky1p modulates salt tolerance, membrane potential and the Trk1,2 potassium transporter. *Biochim. Biophys. Acta* **1565**:36-40.
- Gaber, R. F., C. A. Styles, and 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.
15. **Gadura, N., L. C. Robinson, and C. A. Michels.** 2006. Glc7-Reg1 phosphatase signals to Yck1,2 casein kinase 1 to regulate transport activity and glucose-induced inactivation of *Saccharomyces* maltose permease. *Genetics* **172**:1427–1439.
  16. **Gilbert, W., C. W. Siebel, and C. Guthrie.** 2001. Phosphorylation by Sky1p promotes Npl3p shuttling and mRNA dissociation. *RNA* **7**:302–313.
  17. **Goossens, A., N. de La Fuente, J. Forment, R. Serrano, and F. Portillo.** 2000. Regulation of yeast H(+)-ATPase by protein kinases belonging to a family dedicated to activation of plasma membrane transporters. *Mol. Cell. Biol.* **20**:7654–7661.
  18. **Grossmann, G., M. Opekarova, L. Novakova, J. Stolz, and W. Tanner.** 2006. Lipid raft-based membrane compartmentation of a plant transport protein expressed in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryot. Cell* **5**:945–953.
  19. **Haro, R., and A. Rodriguez-Navarro.** 2002. Molecular analysis of the mechanism of potassium uptake through the TRK1 transporter of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim. Biophys. Acta* **1564**:114–122.
  20. **Hess, D. C., W. Lu, J. D. Rabinowitz, and D. Botstein.** 2006. Ammonium toxicity and potassium limitation in yeast. *PLoS Biol.* **4**:e351.
  21. **Hillenmeyer, M. E., et al.** 2008. The chemical genomic portrait of yeast: uncovering a phenotype for all genes. *Science* **320**:362–365.
  22. **Ingvarsdottir, K., et al.** 2005. H2B ubiquitin protease Ubp8 and Sgf11 constitute a discrete functional module within the *Saccharomyces cerevisiae* SAGA complex. *Mol. Cell. Biol.* **25**:1162–1172.
  23. **Ko, C. H., and R. F. Gaber.** 1991. TRK1 and TRK2 encode structurally related K<sup>+</sup> transporters in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **11**:4266–4273.
  24. **Kuo, M. H., and E. Grayhack.** 1994. A library of yeast genomic MCM1 binding sites contains genes involved in cell cycle control, cell wall and membrane structure, and metabolism. *Mol. Cell. Biol.* **14**:348–359.
  25. **Madrid, R., M. J. Gomez, J. Ramos, and A. Rodriguez-Navarro.** 1998. Ectopic potassium uptake in *trk1 trk2* mutants of *Saccharomyces cerevisiae* correlates with a highly hyperpolarized membrane potential. *J. Biol. Chem.* **273**:14838–14844.
  26. **Malac, J., E. Urbankova, K. Sigler, and D. Gaskova.** 2005. Activity of yeast multidrug resistance pumps during growth is controlled by carbon source and the composition of growth-depleted medium: DiS-C3(3) fluorescence assay. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **37**:2536–2543.
  27. **Malinsky, J., M. Opekarova, and W. Tanner.** 2010. The lateral compartmentation of the yeast plasma membrane. *Yeast* **27**:473–478.
  28. **Manlandro, C. M., D. H. Haydon, and A. G. Rosenwald.** 2005. Ability of Sit4p to promote K<sup>+</sup> efflux via Nha1p is modulated by Sap155p and Sap185p. *Eukaryot. Cell* **4**:1041–1049.
  29. **Maresova, L., S. Muend, Y. Q. Zhang, H. Sychrova, and R. Rao.** 2009. Membrane hyperpolarization drives cation influx and fungicidal activity of amiodarone. *J. Biol. Chem.* **284**:2795–2802.
  30. **Mendoza, I., F. Rubio, A. Rodriguez-Navarro, and J. M. Pardo.** 1994. The protein phosphatase calcineurin is essential for NaCl tolerance of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **269**:8792–8796.
  31. **Mulet, J. M., et al.** 1999. A novel mechanism of ion homeostasis and salt tolerance in yeast: the Hal4 and Hal5 protein kinases modulate the Trk1-Trk2 potassium transporter. *Mol. Cell. Biol.* **19**:3328–3337.
  32. **Munson, A. M., et al.** 2004. Yeast ARL1 encodes a regulator of K<sup>+</sup> influx. *J. Cell Sci.* **117**:2309–2320.
  33. **Navarrete, C., et al.** 2010. Lack of main K<sup>+</sup> uptake systems in *Saccharomyces cerevisiae* cells affects yeast performance both in potassium sufficient and limiting conditions. *FEMS Yeast Res.* **10**:508–517.
  34. **Perez-Valle, J., et al.** 2007. Key role for intracellular K<sup>+</sup> and protein kinases Sat4/Hal4 and Hal5 in the plasma membrane stabilization of yeast nutrient transporters. *Mol. Cell. Biol.* **27**:5725–5736.
  35. **Porat, Z., N. Wender, O. Erez, and C. Kahana.** 2005. Mechanism of polyamine tolerance in yeast: novel regulators and insights. *Cell. Mol. Life Sci.* **62**:3106–3116.
  36. **Posas, F., M. Camps, and J. Arino.** 1995. The PPZ protein phosphatases are important determinants of salt tolerance in yeast cells. *J. Biol. Chem.* **270**:13036–13041.
  37. **Proszynski, T. J., et al.** 2005. A genome-wide visual screen reveals a role for sphingolipids and ergosterol in cell surface delivery in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**:17981–17986.
  38. **Ramos, J., R. Alijo, R. Haro, and A. Rodriguez-Navarro.** 1994. TRK2 is not a low-affinity potassium transporter in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* **176**:249–252.
  39. **Rao, R., D. Drummond-Barbosa, and C. W. Slayman.** 1993. Transcriptional regulation by glucose of the yeast PMA1 gene encoding the plasma membrane H(+)-ATPase. *Yeast* **9**:1075–1084.
  40. **Rodriguez-Navarro, A.** 2000. Potassium transport in fungi and plants. *Biochim. Biophys. Acta* **1469**:1–30.
  41. **Rodriguez-Navarro, A., and J. Ramos.** 1984. Dual system for potassium transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* **159**:940–945.
  42. **Ruiz, A., L. Yenush, and J. Arino.** 2003. Regulation of ENA1 Na(+)-ATPase gene expression by the Ppz1 protein phosphatase is mediated by the calcineurin pathway. *Eukaryot. Cell* **2**:937–948.
  43. **Sambrook, J., and D. W. Russell.** 2001. *Molecular cloning: a laboratory manual*, 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
  44. **Serrano, R.** 1980. Effect of ATPase inhibitors on the proton pump of respiratory-deficient yeast. *Eur. J. Biochem.* **105**:419–424.
  45. **Serrano, R., M. C. Kielland-Brandt, and G. R. Fink.** 1986. Yeast plasma membrane ATPase is essential for growth and has homology with (Na<sup>+</sup> + K<sup>+</sup>), K<sup>+</sup>- and Ca<sup>2+</sup>-ATPases. *Nature* **319**:689–693.
  46. **Serrano, R., A. Ruiz, D. Bernal, J. R. Chambers, and J. Arino.** 2002. The transcriptional response to alkaline pH in *Saccharomyces cerevisiae*: evidence for calcium-mediated signalling. *Mol. Microbiol.* **46**:1319–1333.
  47. Reference deleted.
  48. **Venancio, T. M., S. Balaji, and L. Aravind.** 2010. High-confidence mapping of chemical compounds and protein complexes reveals novel aspects of chemical stress response in yeast. *Mol. Biosyst.* **6**:175–181.
  49. **Wu, P. Y., and F. Winston.** 2002. Analysis of Spt7 function in the *Saccharomyces cerevisiae* SAGA coactivator complex. *Mol. Cell. Biol.* **22**:5367–5379.
  50. **Yenush, L., S. Merchan, J. Holmes, and R. Serrano.** 2005. pH-responsive, posttranslational regulation of the Trk1 potassium transporter by the type 1-related Ppz1 phosphatase. *Mol. Cell. Biol.* **25**:8683–8692.
  51. **Yenush, L., J. M. Mulet, J. Arino, and R. Serrano.** 2002. The Ppz protein phosphatases are key regulators of K<sup>+</sup> and pH homeostasis: implications for salt tolerance, cell wall integrity and cell cycle progression. *EMBO J.* **21**:920–929.