

BOMBAS DE PROTONES VACUOLAR Y PLASMÁTICA COLABORAN EN LA HOMEOSTASIS DE pH DE LA LEVADURA.

Martínez-Muñoz, G.A. y Kane, P.

SUNY Upstate Medical University. Dept. Biochemistry and Molecular Biology.
4210 WH. 750 East Adams St., Syracuse, NY 13210.

Tel. 56232510, gloria_martinez2006@yahoo.com.mx

Numerosos factores juegan un importante papel en la homeostasis de pH, evento indispensable para la sobrevivencia de las células. En dicho mecanismo, las ATPasas translocadoras de protones vacuolares (V-ATPasas), juegan un papel central. En la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, las mutantes carentes de toda actividad de V-ATPasa (mutantes *vma*), son viables; sin embargo, la pérdida de la actividad de esta enzima en eucariotes diferentes a hongos, es letal. Estas enzimas son las responsables de la acidificación de organelos tales como vacuola/lisosomas, aparato de Golgi, y endosomas. Además, es importante enfatizar que numerosos procesos celulares dependen de la acidificación de los organelos a través de la actividad de dicha enzima. Las mutantes *vma* son incapaces de crecer a pH menor de 3 y mayor de 7, fenotipo *Vma*⁻ que sugiere una importante perturbación de la homeostasis de pH, a la fecha no completamente comprendida. Por otra parte, la H⁺-ATPasa plasmática (Pma1p), es una enzima esencial localizada en la membrana plasmática que juega un papel crucial en la regulación del pH interno. Sin embargo, poco es sabido acerca de la coordinación existente entre la Pma1 y las V-ATPasas. Para la medición del pH interno de la levadura, se utilizaron fluoróforos-radiométricos sensibles a pH, específico de vacuola (BCECF) y de citosol (pHLuorin). Estos colorantes fueron introducidos en células silvestres y en mutantes *vma* (estas últimas carentes de alguna de las subunidades de la V-ATPasa). Tal y como ya ha sido descrito (Calahorra *et al.*, 1998, *Yeast* 14:501), en células silvestres sometidas a un breve ayuno, la adición de glucosa provocó la acidificación vacuolar y la alcalinización citosólica; además la subsecuente adición del ion potasio, incrementó el pH de ambos compartimentos. En contraste, la adición de glucosa en las mutantes *vma* o en las células silvestres tratadas con un inhibidor de la V-ATPasa (concanamicina A), resultó en el incremento del pH vacuolar. La homeostasis de pH en el citosol también fue perturbada de manera importante en las mutantes *vma*. Aún a pH extracelular de 5 –condiciones óptimas para su crecimiento- el pH citosólico fue más ácido, y la respuesta a glucosa fue mucho menor en las mutantes. En fracciones de membrana plasmática aisladas de las mutantes, la actividad de la H⁺-ATPasa plasmática, fue de 65-75% menor que en las fracciones de la cepa silvestre. La microscopía de fluorescencia confirmó los niveles abatidos de la H⁺-ATPasa plasmática y su incremento en la vacuola y otros compartimentos de las mutantes. Esta misma enzima no se deslocalizó en las células tratadas con concanamicina, sin embargo, estas mismas sí presentaron una importante reducción en el pH citosólico bajo todas las condiciones ensayadas. Las conclusiones más importantes de este trabajo son: a) La V-ATPasa es crucial en la regulación del pH citoplásmico y vacuolar, b) Las H⁺-ATPasas vacuolar y plasmática muestran una importante coordinación en la homeostasis de pH interno de la levadura. (Martínez-Muñoz and Kane, *JBC* 2008, 283:20309).