

21  
Des.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

**Efectos del estrés por sal  
en el metabolismo nitrogenado  
de *Saccharomyces cerevisiae***

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

**B I O L O G O**

P R E S E N T A :

**JOSE LUIS BUSTO SANCHEZ**



MEXICO, D. F.



1995

FACULTAD DE CIENCIAS  
SECCION ESCOLAR

**FALLA DE ORIGEN**

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AVENIDA DE  
MEXICO

**M. EN C. VIRGINIA ABRIN BATULE**  
Jefe de la División de Estudios Profesionales  
Facultad de Ciencias  
Presente

Los abajo firmantes, comunicamos a Usted, que habiendo revisado el trabajo de Tesis que realiz(ó)ron el pasante(s) Busto Sánchez José Luis

con número de cuenta 8233887-1 con el Título: "Efectos del estrés por sal en el metabolismo nitrogenado de Saccharomyces cerevisiae"

Otorgamos nuestro **Voto Aprobatorio** y consideramos que a la brevedad deberá presentar su Examen Profesional para obtener el título de Biólogo

GRADO	NOMBRE(S)	APELLIDOS COMPLETOS	FIRMA
Dr. Director de Tesis	Jesús Fernando	Montiel Aguirre	
Biol.	Raquel	Ortega Muñoz	
M. en C.	Luisa	Alba Lois	
Dra. Suplente	Alejandra	Mainero del Paso	
M. en IBB. Suplente	Emma Cecilia	Saavedra Irujo	

A mis papas, José Luis Y Gloria  
por todo el apoyo que he  
recibido de ellos, gracias.

A mi abuelita Esperanza

A mis abuelitos Maruca e Higinio.

A mis hermanos Edith, Hugo y Julieta.

A Mariana

A Paty Suaznavar

Especialmente a mi primo Alejandro por la  
convivencia durante los momentos de trabajo  
asi como en los de esparcimiento.

A mi tia Chivis.

A mi tio Carlos.

A mis tios consentidos: Luli y David,  
asi como a Omar y Liz.

A mi prima Adri.

A toda mi familia con especial cariño.

A mis mejores amigos. Job, C. Luis y Diana.

A mis amigos: Emma, Rosalinda, Fernando, David,  
Georgina, Paty, Vianey, Lupis, Greco, Mónica y  
Viétnica por todos los momentos que compartimos  
durante la carrera.

A mis compañeros de laboratorio Anita Velasco  
y Carlos Luna por su amistad y valiosa  
ayuda en las actividades del laboratorio.

Agradezco de manera especial al Dr. Fernando Montiel el que me permitiera realizar la parte experimental en el laboratorio que dirige, así como la enseñanza que he recibido durante mi estancia y la cual es parte de la formación académica y de trabajo en el laboratorio. Agradezco también el que me haya brindado su amistad.

Agradezco a la bióloga Raquel Ortega quien compartió su experiencia en el laboratorio para poder iniciar esta serie de investigaciones en torno al estrés salino, la cual ha resultado en una colaboración fructífera en el estudio de este fenómeno.

Agradezco a la M. en C. Luisa Alba, a la Dra. Alejandra Mainero y la M. en IBB. Emma Saavedra, el haber aceptado formar parte de la Comisión Dictaminadora, así como los comentarios y recomendaciones que hicieron acerca del presente trabajo.

Agradezco también a los compañeros del laboratorio 103, Carlos Mújica y Alejandro Tovar sus comentarios y consejos prácticos sobre la cuantificación de las actividades enzimáticas.

Quiero dar las gracias a todos los compañeros de los laboratorios de bioquímica como Ivonne, Helen, Felipe, J. Juan, Pilo, Alicia G. y Elda Beltrán.

Le agradezco también a Marisa Reyes el haber revisado parte de los manuscritos previos a este trabajo, así como por sus observaciones.

Este trabajo se llevó a cabo en el laboratorio 105 del departamento de Bioquímica y Farmacia de la Facultad de Química, conjunto E. UNAM. bajo la dirección del Dr. Fernando Montiel A. y la Bióloga Raquel Ortega M. Para su realización se contó con el apoyo económico de la Fundación UNAM así como de CONACYT.



## INDICE GENERAL

<b>INDICE GENERAL</b>	i
<b>INDICE DE FIGURAS</b>	v
<b>I. RESUMEN</b>	1
<b>II. INTRODUCCION</b>	3
1.- El fenómeno de estrés. Consideraciones históricas.	3
1.1.-Concepto de estrés.	3
1.2.-Antecedentes históricos.	5
1.3.-Función de las proteínas de estrés.	5
2.- El problema de la sal en los seres vivos y en la agricultura.	6
3.- El estrés por sal.	7
3.1.-Estrés osmótico.	8
3.2.-Osmoregulación.	9
3.3.-Participación de los iones como perturbadores en la función de las macromoléculas.	9
4.- Solutos compatibles u osmolitos protectores. Características.	10
4.1.- Posibles mecanismos de acción de los osmolitos protectores u osmoprotectores.	11
4.2.- Aminoácidos y derivados aminados como osmolitos protectores.	12
4.2.1.- Prolina.	12
4.2.2.- Urea y metilaminas.	13
4.2.3.- Glutamato.	13
4.3.- Sistemas de transporte de solutos para la osmoregulación en procariontes.	14
4.4.- Sensores de los cambios osmóticos.	14

	ii
4.5.- Implicaciones evolutivas.	15
5.- <i>Saccharomyces cerevisiae</i> como modelo de laboratorio.	15
6.- Metabolismo nitrogenado de levaduras.	17
6.1.-Sistemas catabólicos.	17
6.2.-Glutamato deshidrogenasa (EC 1.4.1.2.) (GDH).	19
6.3.- Glutamino sintetasa (EC 6.3.1.2.) (GS).	21
7.- <i>Saccharomyces cerevisiae</i> en condiciones de estrés salino.	22
<b>III. HIPÓTESIS</b>	24
<b>IV. OBJETIVOS</b>	24
<b>V. MATERIAL Y METODO</b>	25
1.- Material Biológico.	25
2.- Curva de Crecimiento de levaduras control y adaptadas a concentraciones crecientes de NaCl.	25
3.- Adaptacion de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> a concentraciones crecientes de NaCl.	25
3.1.-Cosecha de Levaduras.	26
4.- Extracción de Proteínas	27
4.1-Extracción de proteínas para determinar actividad de glutamato deshidrogenasa (GDH- NAD <sup>+</sup> ) (EC 1.4.1.2).	27
4.2-Extracción de proteínas para cuantificar la actividad de glutamino sintetasa (GS) (EC 6.3.1.2).	27

5.- Electroforésis de proteínas totales en geles de poliacrilamida	28
5.1-Deshidratación y montado de gel de electroforésis en láminas de celofan.	30
6.-Determinación de las actividades enzimáticas	30
6.1.-Determinación de la actividad de la glutamato deshidrogenasa (EC 1.4.1.2) (GDH- NAD <sup>+</sup> ) de levadura. Reacción aminativa.	30
6.2-Determinación de la actividad enzimática de la glutamato deshidrogenasa (GDH-NAD <sup>+</sup> ) (EC 1.4.1.2) de levadura. Reacción desaminativa.	32
6.3- Determinación de la actividad de la glutamino sintetasa (EC 6.3.1.2) (GS) de levadura.	33
6.3.1.-Curva patrón de $\gamma$ -glutamihidroxamato.	34
6.3.2.-Ensayo para determinar la formación de $\gamma$ -glutamihidroxamato en diferentes tiempos de incubación.	35
7.- Cuantificación de proteína.	35
8.- Análisis estadístico.	36
<b>VI. RESULTADOS</b>	37
1.- Crecimiento de <i>S. cerevisiae</i> .	37
1.1.-Tiempo de generación para cada población.	37
2.- Electroforésis de proteínas totales de <i>S. cerevisiae</i> .	40
3.- Determinaciones enzimáticas.	44
3.1.- Actividad de la glutamato deshidrogenasa (EC 1.4.1.2.) de <i>S. cerevisiae</i> . Reacción aminativa.	44

3.2.- Actividad de la glutamato deshidrogenasa (EC 1.4.1.2.) de <i>S. cerevisiae</i> . Reacción desaminativa.	44
3.3.- Actividad de la glutamino sintetasa (EC 6.3.1.2.) de <i>S. cerevisiae</i> .	47
3.3.1.- Determinación de la cantidad de producto formado.	48
3.3.2.- Formación de producto a través del tiempo.	48
3.3.3.- Cuantificación de proteína.	48
3.3.4.- Actividad de la glutamino sintetasa (EC 6.3.1.2.) de <i>S. cerevisiae</i> control y adaptada a concentraciones crecientes de NaCl.	51
<b>VII. DISCUSIÓN</b>	53
<b>VIII. REFERENCIAS</b>	59

## INDICE DE FIGURAS

### Figura.

1.- Productos del catabolismo de los principales compuestos nitrogenados.	18
2.- Curva de crecimiento de <i>S. cerevisiae</i> . Crecimiento de levaduras en medio YPD líquido sin sal y adicionado con concentraciones de NaCl 0.34 M, 0.68 M y 1 M.	38
3.- Curva de crecimiento de <i>S. cerevisiae</i> . Tiempo en el que se alcanza una fase estacionaria de crecimiento de <i>S. cerevisiae</i> con NaCl 0.68 M y 1 M comparado contra la población control.	39
4.-Proteínas totales de <i>S. cerevisiae</i> control y adaptadas a concentraciones crecientes de NaCl separadas mediante electroforesis en condiciones desnaturalizantes.	42
5.-Separación de proteínas totales de <i>S. cerevisiae</i> obtenidas y tratadas de igual forma que en la Figura 4, excepto que en el carril 8 la concentración de proteína fue de 0.72 µg.	43
6.- Actividad aminativa de la glutamato deshidrogenasa de <i>S. cerevisiae</i> .	45
7.- Actividad desaminativa de la glutamato deshidrogenasa de <i>S. cerevisiae</i> .	46
8.- Curva patrón de $\gamma$ -glutamihidroxamato comercial.	49
9.- Formación de $\gamma$ -glutamihidroxamato en función del tiempo.	50
10.- Curva patrón de proteína (seroalbúmina bovina).	51
11.- Actividad de la glutamino sintetasa de <i>S. cerevisiae</i> .	52
12.- Metabolismo del glicerol en levaduras.	57

## I. RESUMEN

El cloruro de sodio es una sal que por diversos factores abióticos como la evaporación puede incrementar su concentración en el medio externo de algunos organismos tales como bacterias, protozoarios y algunos vegetales aumentando la osmolaridad externa y actuando como agente estresante. Uno de los primeros eventos de tipo fisicoquímico que tiene lugar en estas circunstancias es la salida de agua citoplásmica lo que tiende a equilibrar las concentraciones de solutos internos con los solutos externos. Los mecanismos de osmoregulación involucrados incluyen la producción y acumulación de osmolitos que probablemente ayudan a la célula a continuar con una actividad normal, así como la síntesis de proteínas que se han denominado proteínas de estrés por expresarse en mayor cantidad durante esta situación.

El patrón electroforético de proteínas totales de *S. cerevisiae* crecida en medio sin sal y bajo concentraciones crecientes de NaCl, confirma la sobreexpresión de bandas proteicas con peso molecular aproximado de 26, 29,45 y 63 kDa. (Varela et al, 1992). Sin embargo, en las células crecidas con sal, también se observan dos bandas proteicas con un peso aproximado de 41.5 y 53.6 kDa de las que no se tiene reporte alguno.

La exposición de levaduras a soluciones con una alta concentración de sales origina, entre otros mecanismos de respuesta, la producción y acumulación de osmolitos compatibles tales como el glicerol y la trealosa (Varela, 1992; Larsson, 1987; André, 1991; Ólz, 1993). Sin embargo, dado que en la respuesta a este tipo de estrés en organismos filogenéticamente distantes como lo son las bacterias y los vegetales frecuentemente se observa la acumulación de compuestos que incluyen nitrógeno como parte de su molécula, puede afirmarse que este fenómeno está ampliamente distribuido a lo largo

de evolución desde procariontes hasta eucariontes (Measures, 1975). Estudios previos en nuestro laboratorio han mostrado que bajo estas condiciones de estrés salino células vegetales en cultivo presentan una clara alteración en la actividad de dos enzimas claves del metabolismo nitrogenado: glutamato deshidrogenasa (GDH) y glutamino sintetasa (GS). Por lo que respecta a la levadura aunque como ya se dijo, este organismo no parece acumular preferencialmente compuestos nitrogenados durante el estrés salino, sí se observó un cambio en la actividad catalítica de la GDH y de la GS cuando las levaduras fueron crecidas bajo NaCl a una concentración de 1 M. Este cambio podría estar relacionado con la biosíntesis del glicerol el cual es el osmolito que se acumula en mayor concentración en las levaduras bajo una condición de estrés salino.

## II. INTRODUCCION

### 1.- El fenómeno de estrés. Consideraciones históricas.

La adaptabilidad es probablemente una de las características más distintivas de la vida ya que las condiciones del entorno de un organismo como temperatura, luz, nutrientes, concentración de oxígeno etc. no son constantes. Estas cambian o fluctúan a lo largo del día o de temporadas estacionales, pudiendo inclusive presentarse cambios radicales imprevistos como heladas, inundaciones, granizadas, sequías, etc.. Aún en estas situaciones, los organismos responden realizando ajustes que les permiten mantener un medio interno con condiciones constantes; es así que el fisiólogo norteamericano W. B. Cannon acuñó la palabra **homeóstasis** (griego homos = similar y stasis = estado) para designar a los procesos fisiológicos coordinados que mantienen las condiciones constantes en un organismo; estos procesos son diversos y se realizan de manera activa (Hoar, 1975).

#### 1.1.-Concepto de estrés.

Por lo que respecta al concepto de estrés, el investigador Hans Selye menciona que "todo mundo sabe que es estrés, pero al mismo tiempo nadie sabe su significado preciso" (Selye,1973). Esta palabra tiene diversos significados para diferentes personas o profesiones. Es un término que originalmente tiene implicaciones en el terreno de la mecánica; se utiliza para definir una fuerza que es ejercida sobre un cuerpo. De acuerdo con las leyes del movimiento de Newton, una fuerza siempre es contrarrestada por una fuerza contraria. Si un cuerpo A ejerce una fuerza sobre un cuerpo B, el cuerpo B también ejerce una fuerza contraria sobre A. Dichas fuerzas son denominadas acción y reacción respectivamente y son partes de un todo conocido como estrés (Levitt, 1980). Sin embargo, el término estrés actualmente también es aplicado a sistemas biológicos y todos han escuchado o mencionado algo sobre él. La palabra estrés fue



trasladada al terreno de la biología por el investigador canadiense Hans Selye quien en 1936 observó que un organismo como la rata, cuando es expuesto a agentes nocivos de diversa naturaleza tales como daño quirúrgico, frío y drogas, entre otros, presenta un cuadro con manifestaciones agrupables como un síndrome, en el que órganos como el timo, glándulas adrenales y nódulos linfáticos se alteran de manera similar independientemente del tipo de daño ejercido. En este trabajo pionero con ratas estresadas con choque eléctricos, Selye (1936) estableció tres estados para lo que él denominó el Síndrome General de Adaptación "GAS" (General Adaptation Syndrome):

Primer estado, reacción de alarma. Se presenta en un período de 6 a 48 horas; se observa un decremento en el tamaño del timo, bazo, nódulos linfáticos e hígado, disminución del tejido graso, pérdida del tono muscular y falta de control en el mantenimiento de la temperatura corporal, entre otros.

Segundo estado, resistencia. Se presenta en un período inicial de 48 horas y con una duración de uno a tres meses, durante el cual el crecimiento corporal cesa, pero la apariencia y función de los órganos retorna prácticamente a la normalidad.

Tercer estado, agotamiento. Este se presenta cuando el estímulo dañino ejercido continúa y si éste es más severo, el organismo pierde su capacidad de resistencia y, por lo tanto, muere.

Los factores que producen el estado de estrés son denominados "estresores", pero de manera general se puede considerar que cualquier factor del medio potencialmente desfavorable para los organismos es también potencialmente estresante (Levitt, 1980). A partir de estos conceptos podemos decir entonces que la resistencia al estrés es la capacidad que presenta un organismo para sobrevivir a un factor desfavorable y crecer en su presencia (Levitt, 1980).

### **1.2.-Antecedentes históricos.**

La respuesta de los organismos vivos a un estrés de tipo abiótico muestra notables semejanzas a lo largo de la escala filogenética. En estas adaptaciones operan niveles como el de la expresión génica y sus productos, fácilmente identificables en la respuesta al estrés por calor o "choque calórico" en la que se observa un incremento en la síntesis de proteínas que habían sido sintetizadas mínimamente antes de la exposición al exceso de temperatura (Ashburner y Bonner, 1979). La primera referencia de este tipo fué reportada por el investigador italiano F. Ritossa quien en 1963 observó cambios en los patrones de ensanchamiento de los cromosomas politénicos de las glándulas salivales de la mosca de la fruta *Drosophila*. Estos nuevos patrones de ensanchamiento se presentaron al incrementar la temperatura de incubación en cinco grados centígrados i. e. de 25° C a 30° C. sugiriendo una posible alta actividad génica en esas regiones ensanchadas (Ritossa, 1963).

Las proteínas cuya síntesis se incrementa por el calor como agente estresante se conocen como proteínas de choque calórico, HSP (heat shock proteins); actualmente se tienen identificadas familias de genes que codifican proteínas de choque calórico con un peso similar, como es el caso de las HSP70 (Lindquist, 1988). Estas proteínas pueden ser inducidas por otros agentes estresantes como el etanol, los metales pesados, las sales de arsénico y las infecciones por virus, entre otros, por lo que también se pueden denominar proteínas de estrés, término que reconoce que una respuesta similar puede ser originada por diversos agentes estresantes (Hightower, 1991).

### **1.3.-Función de las proteínas de estrés.**

Uno de los aspectos más interesantes que surgieron en el estudio de las proteínas de choque calórico es su posible papel durante la situación de estrés. Algunas proteínas de estrés han sido identificadas como chaperonas, proteínas que impiden la asociación

incorrecta dentro y entre cadenas polipeptídicas durante el plegamiento de las proteínas sintetizadas *de novo* y que también podrían participar en la protección de proteínas pre-existentes en células bajo estrés calórico (Hightower, 1991; Martin et al, 1993). El término de chaperona es aplicado a las proteínas de células eucariontes y el de chaperoninas a las de organismos procariontes y organitos celulares (mitocondria y cloroplasto) (Ellis et al, 1991; Hemmingsen et al, 1988). Para llevar a cabo su función requieren de energía ya que se ha observado una actividad de ATPasa, como en el caso de las chaperoninas GroEL y GroES de la enterobacteria *Escherichia coli*, las cuales actúan sobre una proteína no plegada o desnaturalizada (Martin et al, 1993). Esta función es particularmente crítica ya que como se indicó anteriormente, el plegamiento de proteínas *in vitro* puede presentar infinidad de posibles interacciones termodinámicamente favorables pero sin una actividad funcional. El papel que desempeñan estas chaperonas ha revolucionado el concepto tradicional en el que la estructura terciaria proteica *in vivo* estaría dictada sólo por la secuencia de aminoácidos o estructura primaria. Así, lo que parecía una generalidad derivada del caso de la ribonucleasa ha sido en realidad una gran excepción (Gething y Sambrook, 1992).

## **2.- El problema de la sal en los seres vivos y en la agricultura.**

A lo largo de la evolución orgánica se ha presentado una fuerte presión selectiva de los organismos ante diversos tipos de estrés hídrico tales como sequía y fluctuación en la concentración de sales así como variaciones de la temperatura ambiental (Yancey et al, 1982).

La evaporación de grandes mantos acuíferos, por ejemplo, puede tener como consecuencia un aumento en la concentración de sales, tal como ha ocurrido con el Mar Muerto en Asia o con el Gran Lago Salado (Great Salt Lake, EEUUA) en los que las concentraciones del catión  $\text{Na}^+$  son de 1500 mM y 5900 mM respectivamente y para el anión  $\text{Cl}^-$  de 4600 mM y 5100 mM (Brown, 1990). Sin embargo, la carencia de agua ha sido una de las mayores fuerzas selectivas en la evolución vegetal

y la capacidad para competir con esta insuficiencia hídrica es determinante en la distribución natural de las plantas en general, así como de las especies económicamente útiles en particular (Hanson, 1982). Esto, aunado a que las tierras cultivables por riego se encuentran frecuentemente asociadas a un nivel de evaporación elevado en las regiones áridas y semiáridas, lo que provoca la acumulación de grandes cantidades de sales en la superficie del terreno irrigado con la consecuente disminución en el rendimiento agrícola del mismo (Fitzpatrick, 1984). La proporción de tierra afectada por salinidad tiene un intervalo de valores de entre 3.4 y 9 millones de Km<sup>2</sup>, lo que significa que entre 13% y 30 % de la tierra irrigada es afectada por sales (Flowers y Yeo, 1988). Esto refleja el efecto acumulado que han tenido décadas o siglos de adicionar agua al suelo para sostener el crecimiento de especies vegetales agrícolas. Las sales contenidas en el agua de riego se quedan en el suelo una vez que ésta se evapora. El cloruro de sodio (NaCl) inhibe el crecimiento vegetal y es la sal que se encuentra en mayor proporción en las tierras que sufren un incremento en la cantidad de sales (Evans et al, 1983).

En el pasado, los mayores esfuerzos para luchar contra la salinidad han sido dirigidos a prácticas de desalinización de tierras pero éstas tienen un alto costo y son, sobre todo, imprácticas en países en vías de desarrollo. Otro tipo de solución es mediante el mejoramiento de especies agrícolas resistentes a la sal a través de modificaciones genéticas (Epstein et al., 1980; Haro et al., 1993; Tarczynski et al., 1993; Evans et al., 1983; Gaxiola et al., 1992).

### **3.-El estrés por sal.**

En un estrés de tipo abiótico como el provocado por un exceso de sales y por una deficiencia o exceso de agua, al igual que en el estrés de tipo calórico, la respuesta de los organismos puede estar muy conservada (Close y Lammers, 1993). En este caso, el cambio en la concentración de sales del medio externo produce una

entrada o salida de agua a través de la membrana celular que funciona como una barrera para ciertos solutos, pero permite el libre paso del agua, promoviendo un equilibrio entre las concentraciones interna y externa; ésto produce un cambio inicial en el volúmen celular (Csonka, 1991). El estrés salino tiene por una parte un efecto primario el cual puede ser directo, como un daño de tipo tóxico, o un daño indirecto como las alteraciones de tipo metabólico y la inhibición del crecimiento y desarrollo. Por otra parte, un efecto secundario incluye deficiencia en la toma de nutrientes y, adicionalmente, un estrés de tipo osmótico (Csonka, 1989).

### **3.1.- Estrés osmótico.**

El estrés osmótico es una consecuencia de la presencia de organismos no adaptados en un medio en el que fluctúa la concentración de sales u otro tipo de moléculas osmóticamente activas; al aumentar estas últimas en el medio externo se incrementa la osmolaridad con la consecuencia de una pérdida de la turgencia celular (Evans et al, 1983; Close y Lammers, 1993). En general, un organismo no puede modificar el medio externo por sí mismo pero tiene dos posibles formas de hacerle frente: una es evitarlo, ya sea a través de la exclusión total o parcial mediante barreras físicas que lo aislen; al desaparecer el estrés, se elimina la tensión ejercida. Por otra parte puede resistir al estrés tolerándolo, es decir, manter un equilibrio con el estrés sin sufrir un daño o, como apunta Selye (1973), en un estado de resistencia. Un organismo que es tolerante al estrés es capaz de prevenir, disminuir o reparar el daño producido por la tensión ejercida por dicho estrés (Levitt, 1980; Evans et al, 1983).

### **3.2.-Osmoregulación.**

La respuesta de los organismos de los diferentes reinos biológicos a cambios en la osmolaridad, presenta notables semejanzas, ya que la causa y el efecto son de naturaleza fisicoquímica, como la ósmosis en sí y la presión osmótica (Csonka, 1991). La osmoregulación se define como la regulación del potencial osmótico interno de una célula por adición o eliminación de solutos en solución para hacer frente al estrés osmótico y evitar la deshidratación, hasta un punto en el que el potencial osmótico intracelular sea aproximadamente igual al potencial del medio que rodea a la célula (Heuer, 1994; Csonka, 1989; Evans et al., 1983). La exposición de un organismo a un medio externo con un incremento en la osmolaridad resulta en la salida del agua interna. La disminución en el contenido de agua interna origina también una disminución en la presión de turgencia y una contracción del volumen citoplásmico; una consecuencia de estos procesos es el aumento de la concentración de los metabolitos intracelulares y al mismo tiempo una reducción en la actividad del agua citoplásmica.

### **3.3.-Participación de los iones como perturbadores en la función de las macromoléculas.**

En la mayoría de las funciones bioquímicas de la célula se requiere de la participación de iones (Boyer, 1970). Sin embargo, el incremento de algunos iones en el medio intracelular puede ser tóxico al modificar o inhibir algunas funciones. Por ejemplo, las sales NaCl y KCl así como sus productos iónicos  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  y  $\text{Cl}^-$  tienen un efecto deletéreo en la actividad enzimática de proteínas vegetales y animales, afectando de manera directa su función catalítica y su constante de afinidad por el sustrato o  $K_M$  (Yancey et al, 1982).

#### 4.- Solutos compatibles u osmolitos protectores. Características.

El organismo responde a un estrés de tipo osmótico incrementando la concentración de un número limitado de moléculas para restaurar algunas de las condiciones en que se encontraba en el estado de pre-estrés; estas moléculas no parecen inhibir los procesos celulares y se han denominado solutos compatibles (Brown y Simpson, 1972). Este término fue introducido por Brown y Simpson en 1972 para describir a las sustancias no-inhedoras que se acumulan en el citoplasma de las células en un medio con una alta osmolaridad.

Los solutos, denominados también osmolitos, muestran una sorprendente evolución convergente entre procariontes, plantas y animales lo que sugiere que solo algunos tipos de solutos son compatibles con las macromoléculas biológicas. Entre los fenómenos que Yancey y colaboradores (1982) observan que se mantienen a lo largo de la escala filogenética está el de la concentración interna del ión potasio [ $K^+$ ] la cual varía muy poco, independientemente de que los valores de presión osmótica ejercida se encuentren en intervalos amplios. La excepción es la arqueobacteria *Hallobacterium salinarium* con valores de 4500 a 5000 nmol/kg agua de ión potasio en un medio de 5.1 M de NaCl (Yancey et al, 1982).

La mayor parte de los osmolitos en eucariontes sometidos a un estrés de tipo hídrico están restringidos a algunas clases de productos metabólicos de bajo peso molecular: polioles como el glicerol, manitol y la sacarosa; aminoácidos libres y derivados de aminoácidos (taurina y  $\beta$ -alanina); urea y metilaminas como el N-óxido de trimetilamina, la betaína y la sarcosina. Cada diferente grupo de osmolitos se encuentra distribuido característicamente en especies que pertenecen al mismo *Phylum* o *Phyla* cercanos (Yancey et al, 1982).

#### **4.1.- Posibles mecanismos de acción de los osmolitos protectores u osmoprotectores.**

El investigador francés LeRudulier ha realizado algunas observaciones importantes en torno a los osmolitos protectores. Una de ellas se refiere al hecho de que para acumularse en grandes concentraciones en el interior de la célula no podrá atravesarla rápidamente sino es mediante la ayuda de sistemas de transporte, tales como las proteínas denominadas porinas (LeRudulier et al., 1984). La gran mayoría de estos osmolitos, denominados también, como ya se dijo, osmoprotectores, no presentan una carga eléctrica neta a pH 7. Así, al acumularse, no perturban la estructura de las macromoléculas celulares (Yancey et al., 1982; Csonka, 1989). En grandes concentraciones no inhiben la actividad enzimática como es el caso de la glicinbetaina y de la prolina (Wyn y Gorham, 1983). Son moléculas con una gran solubilidad en agua por lo que podrían estar de alguna manera hidratando a las proteínas citoplásmicas y estabilizando la estructura nativa de proteínas tipo globular pudiendo éstas continuar con una actividad "normal" (Arakawa y Timasheff, 1985). Por otra parte, se ha observado que algunos azúcares como el glicerol y la sacarosa, al actuar como osmoprotectores, incrementan la temperatura de transición de las proteínas en una solución acuosa (Arakawa y Timasheff, 1982).

Entre algunos otros mecanismos de protección podría considerarse el de que al ser moléculas no polares pueden adoptar estructuras compactas estabilizadas por interacciones hidrofóbicas intramoleculares, que tendrían preferencia sobre proteínas desnaturalizadas por presentar éstas una mayor superficie (Arakawa y Timasheff, 1985). Otro posible mecanismo es el de que la fuerza cohesiva de las moléculas como los azúcares incrementa la tensión superficial del agua lo cual es un factor importante en la interacción de la superficie polar proteica con solventes en sistemas acuosos confiriéndole una estabilidad a la proteína (Arakawa y Timasheff, 1982).



#### **4.2.-Aminoácidos y derivados aminados como osmolitos protectores.**

Existe fuerte evidencia de que algunos aminoácidos y sus derivados son utilizados como osmoprotectores por diversos organismos como invertebrados y vertebrados marinos, bacterias tolerantes y no tolerantes a la sal, plantas halofitas y peces como la lamprea y el celacanto (Yancey et al., 1982). Los aminoácidos, a pesar de tener cargas, se comportan como zwitteriones en los intervalos de pH fisiológico. Por otra parte, estudios *in vitro* muestran que aminoácidos como la glicina, alanina, serina,  $\beta$ -alanina y prolina aún en una concentración de 1 M no afectan la Km de algunas enzimas como la lactato deshidrogenasa y piruvato cinasa (Yancey et al, 1982). Esto sugiere que estos aminoácidos son compatibles con la función enzimática. En cambio, concentraciones menores de 0.5 M de aminoácidos con carga como la arginina y la serina disminuyen inclusive 4 veces la Km de las mismas enzimas (Yancey et al, 1982).

##### **4.2.1.-Prolina.**

La prolina se acumula principalmente en bacterias y células vegetales sometidas a un medio con altos niveles de cloruro de sodio y estrés por deshidratación (Measures, 1975; Heuer, 1994). La prolina adicionada de manera exógena puede eliminar la inhibición del crecimiento en bacterias sometidas a un estrés osmótico; las bacterias gram-positivas pueden aumentar la concentración interna de prolina sin que ésta sea adicionada de manera exógena, lo que sugiere que bajo estas circunstancias la síntesis de prolina podría estar regulada por un control osmótico (Csonka, 1989).

El papel de la prolina como osmolito compatible u osmoprotector podría ser a través de su interacción con las proteínas, incrementando la solubilidad de proteínas con solubilidad reducida, evitando su precipitación al incrementar la capacidad de unión del agua en los complejos prolina-proteína (Le Rudulier et al, 1984). La porción alifática del anillo de prolina se une a los residuos no-polares de las proteínas mediante interacciones hidrofóbicas; por otra parte, los residuos carboxilo e imino altamente cargados podrían

interactuar con el agua, lo que resultaría en una cubierta hidrofílica la cual promovería la solubilidad (Csonka, 1989). Experimentos *in vitro* han mostrado que concentraciones de hasta 6 M promueven la solubilidad de proteínas como la insulina,  $\beta$ -lactoglobulina y albúmina bovina (Yancey et al, 1982).

#### 4.2.2.- Urea y metilaminas.

La urea se presenta en varios organismos como un producto del metabolismo nitrogenado; sin embargo, se sabe que tiene efectos que perturban la estructura de macromoléculas. Por otra parte, el efecto de una alta concentración de urea en la sangre como en el caso del celacanto (el cual tiene una concentración de 400mM) es contrarrestado por la acción de moléculas como las metilaminas, óxido-N-trimetilamina(TMAO), betaina y sarcosina (Yancey et al, 1982). Estudios *in vitro* muestran que las metilaminas como la betaina pueden eliminar la inhibición de la actividad enzimática en la malato deshidrogenasa provocada por una concentración de 300 mM de NaCl (Pollard y Wyn Jones, 1979).

#### 4.2.3.- Glutamato.

Se presenta como osmoprotector principalmente en bacterias sometidas a un medio con altos niveles de NaCl y estrés por deshidratación (Measures, 1975). El glutamato es una molécula que presenta una carga negativa a pH fisiológico, por lo que en el flujo de entrada en bacterias es acompañada por un catión (comunmente  $K^+$ ) el cual también contribuye al balance osmótico.

#### 4.3.- Sistemas de transporte de solutos para la osmoregulación en procariontes.

Existen amplias investigaciones sobre los mecanismos de la osmoregulación en procariontes, sobre todo en bacterias como *S. typhimurium* y *E. coli* las cuales se utilizan como modelo de estudio (Csonka, 1989). Una característica importante que presentan las bacterias es que al igual que ciertos hongos y vegetales tienen pared celular y que inclusive ciertas respuestas a estrés osmótico son similares. Los sistemas protéicos de transporte que se han estudiado se han enfocado principalmente a los que involucran moléculas como la prolina, glicinbetaina y trealosa, entre otras (Csonka, 1991). Se ha observado que existe un control osmótico sobre la transcripción de genes que codifican a dichos sistemas de transporte; algunos de los genes estudiados y su función son los siguientes:

<u>gen</u>	<u>función del producto</u>	<u>referencia</u>
<i>kdpABC</i>	transporte de potasio.	(Csonka, 1991)
<i>PutP</i>	transporte de prolina.	(Csonka, 1989)
<i>proU, proP</i>	transporte de prolina y glicinbetaina.	(Csonka, 1989)
<i>OmpF</i> y <i>OmpC</i>	codifican para porinas	(LeRudulier et al, 1984).
<i>otsA</i> y <i>otsB</i>	síntesis de trealosa.	(Csonka, 1991)
<i>betA, betB</i> y <i>betT</i>	transporte de colina.	(Csonka, 1989)

#### 4.4.- Sensores de los cambios osmóticos.

Los cambios fisicoquímicos provocados por una alteración de la osmolaridad del medio externo podrían ser detectados por proteínas, las cuales estarían involucradas en los mecanismos de respuesta para permitir la osmoregulación del organismo. Para bacterias, dichas proteínas podrían tener algunas de las siguientes funciones (Csonka, 1991):

- a) baroreceptores, detectando cambios en la presión hidrostática.
- b) sensores en el espacio periplásmico que detectarían cambios en la presión de turgor.
- c) receptores o sensores que detectarían cambios en el estiramiento de la pared celular y de la membrana.
- d) quimiorreceptores que determinarían las concentraciones internas y externas de solutos.

#### **4.5.-Implicaciones evolutivas.**

El hecho de que organismos filogenéticamente distantes entre sí como bacterias, algas unicelulares, plantas vasculares, invertebrados y vertebrados utilicen sólo un pequeño grupo de osmolitos orgánicos como osmoprotectores sugiere una fuerte presión de selección sobre éstos lo que al parecer se podría interpretar como una evolución de tipo convergente (Yancey, et al., 1982). De esta forma, en lugar de modificar a las proteínas a través de cambios en el material genético que las codifica, resultaría menos costoso el mantener un control sobre los sistemas que regulan el transporte y producción de las moléculas que funcionan como osmoprotectores (Yancey et al., 1982; Measures, 1975).

#### **5.- *Saccharomyces cerevisiae* como modelo de laboratorio.**

La levadura *Saccharomyces cerevisiae* es un eucarionte simple que posee muchas de las características moleculares de las células eucarióticas superiores lo que la hacen un excelente sistema modelo para el estudio del estrés producido por sal. Su material genético se encuentra en el núcleo en la forma de cromatina, se organiza en 17 cromosomas los cuales poseen un centrómero, dos telómeros y múltiples sitios en los cuales se inicia la replicación del ácido desoxiribonucleico (ADN). Las células de levadura también contienen

proteínas eucarióticas características (histonas, actinas, tubulinas) así como también organelos especializados, lo que implica la compartimentalización de moléculas y enzimas. El ciclo de vida presenta tres tipos de células diferentes; existen dos tipos de células haploides, designadas células  $a$  y células alfa ( $\alpha$ ); al fusionarse unas con otras forman un tercer tipo de célula, diploide  $a/\alpha$ . Por otra parte, el contenido de ADN de levadura es de  $9.0 \times 10^9$  daltones, es decir, sólo 4 veces más que el de la enterobacteria *E. coli* (Petes, 1980). Todas estas características han contribuido a que durante los últimos 40 años la levadura haya emergido como un poderoso modelo para estudios bioquímicos y genéticos de eucariontes. Lo anterior se pone de manifiesto con el trabajo de Gaxiola y colaboradores (1992), quienes aislaron genes halotolerantes de levadura (que le confieren resistencia a la sal) denominados *HAL1* Y *HAL2* (Gaxiola et al., 1992; Gläser et al., 1993). *HAL1* parece codificar para una proteína de membrana que regula el transporte de potasio. Este gen también está presente en vegetales superiores como el maíz. *HAL2* presenta similitud con el gen *MET22* el cual participa en la biosíntesis de metionina y es requerido para la asimilación de fosfato; el producto de *HAL2* también muestra similitud con las inositol fosfatasas, las cuales son inhibidas por sales (Gläser et al., 1993).

En levadura, Anderson y colaboradores han aislado el gen *KAT1*, el cual codifica para una proteína que transporta potasio en vegetales (Anderson et al., 1992). Por otra parte, la exclusión de sodio del medio intracelular parece conferir una mayor tolerancia a un estrés por NaCl tanto en levaduras como en plantas superiores. Lo anterior se deriva de los trabajos de Haro y colaboradores (1993), quienes también proponen a *Saccharomyces cerevisiae* como un modelo para estudiar los fenómenos de tolerancia a sal en vegetales.

## 6.- Metabolismo nitrogenado de levaduras.

Los compuestos nitrogenados que son metabolizados por las levaduras tienen tres posibles vías:

- i) Son tomados por las células y son incorporados sin modificación alguna; por ejemplo, la incorporación de aminoácidos a proteínas.
- ii) Pueden ser degradados por las levaduras, liberando el nitrógeno que contienen, generalmente en forma de amonio, y usarlo para la síntesis de otros compuestos.
- iii) El carbón que se encuentra en los compuestos nitrogenados es también utilizado por la célula para la síntesis de compuestos carbonados (Large, 1986).

### 6.1.-Sistemas catabólicos.

Las rutas del catabolismo del nitrógeno pueden ser divididas con base en sus productos finales [Fig 1]. Los sistemas que degradan alantoina, urea o asparagina generan amonio como producto final. En este caso, la enzima glutamato deshidrogenasa (GDH), nicotin adenin dinucleótido fosfato (NADP) dependiente (EC 1.4.1.2.), es requerida para convertir al  $\alpha$ -cetoglutarato y amonio a glutamato, el cual es posteriormente el donador principal de nitrógeno en muchas reacciones biosintéticas (Large, 1986). Otras vías o rutas, como aquellas en las que se degrada prolina y alanina, generan glutamato directamente. Estas observaciones enfatizan o ponen de manifiesto el papel central del amonio y del glutamato como intermediarios en las reacciones catabólicas y anabólicas en las que participa el nitrógeno [Fig. 1], (Cooper, 1982; Stewart et al., 1987) así como los tres sistemas enzimáticos que los relacionan entre sí, como son la glutamato deshidrogenasa NADP<sup>+</sup> dependiente (amonio ---> glutamato), glutamato deshidrogenasa NAD<sup>+</sup> dependiente (glutamato ---> amonio) y en un pequeño número de levaduras el sistema de glutamino sintetasa/glutamato sintasa (Large, 1986).

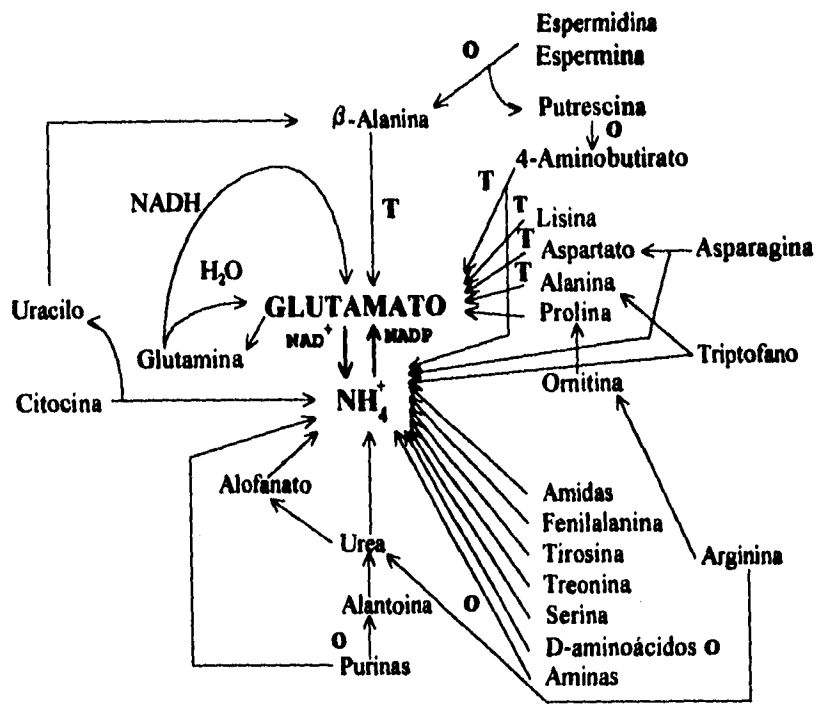


Figura 1.- Productos del catabolismo de los principales compuestos nitrogenados. El amonio y el glutamato son los dos intermediarios centrales en el metabolismo del nitrógeno en levaduras. O hace referencia a una oxidasa, T hace referencia a una transaminasa. Tomado de Large, 1986.

Como muchos otros organismos, *S. cerevisiae* puede utilizar amonio como única fuente de nitrógeno. Por lo tanto, todos los constituyentes de la célula que contienen nitrógeno pueden ser sintetizados a partir de la degradación de las principales fuentes de carbono y amonio. En la utilización del amonio éste se incorpora principalmente como glutamato y glutamina. En el caso de las bacterias y posiblemente en levadura aproximadamente 88% de todo el nitrógeno celular es obtenido del glutamato y el 12% es obtenido de los grupos amida de la glutamina (Magasanik, 1992).

La entrada de amonio a la célula es facilitada por dos o tres permeasas; como ya se menciono, una vez dentro el amonio puede ser utilizado como sustrato junto con el  $\alpha$ -cetoglutarato y NADPH para formar glutamato (Magasanik, 1992).

#### 6.2.-Glutamato deshidrogenasa (EC 1.4.1.2.) (GDH).

La glutamato deshidrogenasa (GDH) (EC 1.4.1.2.) ha sido localizada en la mayoría de los organismos vivos desde procariontes hasta eucariontes como hongos, vegetales y animales. Se encuentra ampliamente distribuida en el reino *Fungi*. En levaduras la conversión de glutamato a amonio y visceversa es catalizada por dos glutamato deshidrogenasas; una utiliza  $\text{NADP}^+$  como cofactor y la otra utiliza  $\text{NAD}^+$  (Magasanik, 1992). Las reacciones son:



Estas reacciones son reversibles y relacionan la biosíntesis y degradación de compuestos nitrogenados. Observaciones de la actividad de la glutamato deshidrogenasa dependiente de  $\text{NAD}^+$  sugieren que en levaduras y célula animales, tiene un papel



principalmente catalítico ya que la concentración de  $\text{NAD}^+$  en el citoplasma es mayor que la concentración de  $\text{NADH}$ , por lo que el equilibrio de la reacción tiende hacia la degradación del glutamato (Stewart et al, 1987). Existe también evidencia de que cuando se coloca a la levadura en un medio con glutamato como fuente de nitrógeno, los niveles de  $\text{GDH-NAD}^+$  son más altos que los niveles de  $\text{GDH-NADH}$  cuando se crece a *S. cerevisiae* en un medio con amonio como fuente de nitrógeno (Miller, 1990). Como se mencionó antes, la enzima glutamato deshidrogenasa presenta dos isoenzimas con una afinidad distinta por los aceptores de electrones  $\text{NAD}^+$  y  $\text{NADP}^+$ . La  $K_M$  de ambas enzimas para el amonio es alta (10 - 50 mM) y se considera que en levadura la enzima responsable de la asimilación de amonio es la glutamato deshidrogenasa dependiente de  $\text{NADP}^+$  (Mifflin y Lea, 1980).

La enzima se localiza en células animales eucariontes en mitocondria, y en vegetales en el cloroplasto; sin embargo, la localización en células del reino *Fungi* y en especial en *Saccharomyces cerevisiae* se presenta principalmente como citosólica (Perlman y Mahler, 1970). Es una enzima hexamérica con un peso de 310,000 a 330,000 daltones integrada por lo menos por dos tipos de subunidades. Cada subunidad tiene un peso aproximado de 53,000 daltones. El pH óptimo en el que efectúa la oxidación deaminativa es de 7.6 y para la reacción de aminación reductiva el pH óptimo es de 8.0 (Stewart et al, 1987). En cuanto a los parámetros cinéticos, Stewart y colaboradores (1987) observan que los valores de  $K_M$  de la glutamato deshidrogenasa de diversos organismos tales como plantas comestibles, hongos, bacterias y animales tienen valores muy similares para el  $\alpha$ -cetoglutarato,  $\text{NAD}^+$ ,  $\text{NADP}^+$  y  $\text{NADPH}$ ; en cambio, los valores de  $K_M$  para el glutamato, el amonio y el  $\text{NADH}$  varían en un amplio margen. En *Saccharomyces cerevisiae*, la  $K_M$  para el glutamato es de 10 mM, para el  $\alpha$ -cetoglutarato es de 0.95 mM, para el amonio de 11.0 mM y los valores para el  $\text{NADP}^+$  y el  $\text{NADPH}$  son de 0.071 mM y 0.085 mM respectivamente. Las propiedades de regulación alostérica de la glutamato deshidrogenasa de *Saccharomyces* pueden ser similares a las de *Neurospora*. La enzima biosintética es

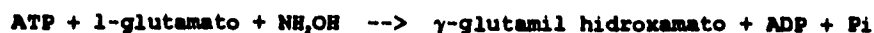
la GDH NADP<sup>+</sup>-dependiente, mientras que la GDH NAD<sup>+</sup>-dependiente es la enzima catabólica. Esta última es inhibida por GTP, GDP y GMP (Miller y Magasanik, 1990). En la inhibición por GTP interviene también el ATP por lo que se propone que esta enzima, al igual que la de hígado bovino, posee dos sitios de unión a coenzimas para su regulación (Stewart et al, 1987).

### 6.3.- Glutamino sintetasa (EC 6.3.1.2.) (GS).

Siendo la glutamina y el amonio compuestos intermediarios esenciales en el metabolismo nitrogenado de todos los organismos, es fácil suponer que la enzima glutamino sintetasa (GS) que cataliza la síntesis del primero se encuentre en todos los niveles desde procariontes hasta eucariontes y que además su actividad no sólo sea necesaria sino indispensable. Lo anterior se ve apoyado por resultados de estudios evolutivos en los que se ha encontrado que el gen que codifica para la glutamino sintetasa es uno de los más antiguos (Kumada et al, 1993). La enzima cataliza dos tipos de reacciones, una de biosíntesis y otra de transferencia. En la reacción de síntesis convierte al glutamato en glutamina al incorporar un grupo amonio, empleando ATP (Stewart et al, 1987).

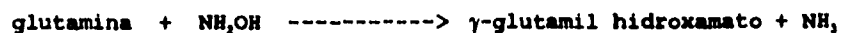


La hidroxilamina como sustrato en lugar del amonio produce  $\gamma$ -glutamil hidroxamato:



En esta reacción, los valores de  $K_M$  y  $V_{max}$  obtenidos con hidroxilamina son similares a los obtenidos con amonio (Stewart et al, 1987).

La glutamino sintetasa también realiza una reacción de transferencia al catalizar la síntesis del  $\gamma$ -glutamil hidroxamato a partir de glutamina e hidroxilamina:



La glutamino sintetasa citoplásmica se denomina como GS1 y en *S. cerevisiae* el gen que la codifica se denomina *GLN1* y se localiza en el cromosoma 16 (Magasanik, 1992). La proteína tiene una cadena de 370 aminoácidos, con un peso molecular de 42,000 daltones y es homóloga a otras glutamino sintetasa. La enzima en forma activa está constituida por 10 a 12 subunidades (Magasanik, 1992; Mitchell y Magasanik, 1983).

#### 7.- *Saccharomyces cerevisiae* en condiciones de estrés salino.

En levaduras, está reportado que al encontrarse éstas en un medio con una alta concentración de sales (0.68 M NaCl) o un medio con potencial hídrico bajo, acumulan polioles a manera de solutos compatibles. Específicamente, hay acumulación de glicerol en la fase logarítmica de crecimiento y arabinitol en la fase estacionaria (André et al., 1991; Larsson y Gustafsson, 1987; Watson, 1970). Sin embargo, todavía no está claro si además de acumular las moléculas antes mencionadas, son también capaces de almacenar osmolitos nitrogenados. Es claro que todavía se desconocen muchos de los factores que participan en la tolerancia al estrés salino (NaCl) en levadura. En general se sabe que es un proceso complejo que involucra muchos genes, algunos de los cuales interactúan de manera aditiva (Dvorák et al., 1988). La resistencia a concentraciones moderadas de NaCl podría depender, por ejemplo, de genes que codifiquen para sistemas transportadores de  $\text{K}^+$  y  $\text{Na}^+$ . En este sentido, *TRK1* y *TRK2* pueden ser genes involucrados en la relación  $\text{K}^+/\text{Na}^+$  (Gaber et al., 1988; Ko y Gaber, 1991; Ramos et al., 1990) y las proteínas producto de los genes *ENA1/ENA2* regulan el

flujo de Na<sup>+</sup> (Mendoza et al., 1994). Así, también la ATPasa vacuolar podría tener un papel importante en mantener las concentraciones adecuadas de Na<sup>+</sup> (Garcia-deblas et al., 1993). También es necesaria una correcta biogénesis de la vacuola para la osmotolerancia en *Saccharomyces cerevisiae* (Latterich y Watson, 1991). Por otra parte, existen reportes de que una proteína-quinasa tipo calcineurina desempeña un papel importante en la tolerancia de levadura a concentraciones de NaCl de 1.5 M. Este mecanismo involucra la fosforilación de proteínas (Mendoza et al., 1994; Nakamura et al., 1993; Robinson et al., 1992), lo cual es parte del mecanismo de transducción de señales que tiene la levadura para percibir los cambios en la osmolaridad externa (Maeda et al., 1994; Brewster et al., 1993). Además, Varela y colaboradores (1992) observaron la sobreexpresión de las proteínas Hsp12 y Hsp26 de choque calórico en levaduras expuestas a una concentración 0.7 M de NaCl en el medio externo.

### III. HIPÓTESIS

Concentraciones crecientes de NaCl en el medio de crecimiento de levaduras provocan cambios en la actividad de las principales enzimas involucradas en el metabolismo del nitrógeno (glutamato deshidrogenasa GDH y glutamino sintetasa GS).

### IV. OBJETIVOS

1.- Determinar si concentraciones crecientes de NaCl en el medio de cultivo tienen efecto en el metabolismo nitrogenado de *Saccharomyces cerevisiae*.

2.- Adaptar a *S. cerevisiae* a concentraciones crecientes de sal (NaCl) (0.34 M, 0.68 M y 1 M) y medir el tiempo de generación como parámetro indicativo de adaptación.

3.- Evaluar cambios en la expresión génica de las levaduras como respuesta a una condición de estrés por sal, mediante la comparación de los patrones electroforéticos de proteínas totales de levaduras control con los de levaduras crecidas en presencia de NaCl (0.34 M, 0.68 M y 1 M de NaCl).

4.- Determinar mediante la actividad enzimática de las enzimas glutamato deshidrogenasa y glutamino sintetasa, si el metabolismo nitrogenado en levaduras se ve afectado cuando son sometidas a un estrés gradual con NaCl.

## V. MATERIAL Y METODO

1.- **Material Biológico.**- Se utilizó *S. cerevisiae* cepa XT 3000/3a ( $\alpha$ -Ade. 1, 2) la cual se mantiene almacenada en cajas de Petri con medio YPD sólido a 4° C.

2.-**Curva de Crecimiento de levaduras control y adaptadas a concentraciones crecientes de NaCl.**

Se colocaron 50 ml de medio YPD (extracto de levadura 10 g/l, peptona 20 g/l, glucosa 20 g/l, H<sub>2</sub>O 1000 ml) en un matríz con capacidad de 250 ml, los cuales fueron inoculados con una población inicial de  $1 \times 10^4$  células/ml contadas en una cámara de Neubauer (Propper, Lumicyte, EE.UU.A.). Los medios inoculados con levaduras fueron incubados en un baño maría "Shaker Bath" (Lab-Line, EE.UU.A.) con una agitación constante de 200 rpm y una temperatura de 30° C. El crecimiento de la población se determinó tomando una alicuota de 20  $\mu$ l en condiciones estériles y haciendo una dilución 1:100 con agua destilada estéril, contando a las células en la cámara de Neubauer. Se considera el final de la fase logarítmica de crecimiento cuando el número poblacional en el tiempo no presenta ya un incremento y permanece constante.

3.-**Adaptación de *Saccharomyces cerevisiae* a concentraciones crecientes de NaCl.**

Las levaduras se adaptaron en medio YPD adicionado con concentraciones de NaCl 0.34 M, 0.68 M y 1 M. El procedimiento se realizó siempre bajo condiciones axénicas. Se partió de una colonia de de levadura crecida en medio YPD sólido (YPD adicionado con agar,

20g/l), la cual se colocó en 3 ml de medio YPD líquido contenido en un tubo con tapón de rosca; se incubó a 30° C durante un periodo de 6 a 8 horas en un incubador microbiológico (Thermolyne, tipo 41900, EE.UU.A.). Posteriormente las células se mezclaron en un "Vortex" (Vortex-genie, Scientific industries inc., EE.UU.A.), para disgregar a los grumos y tomar una alícuota de 20 µl diluyendola (dilución 1:100 o 1:1000). Se contó el número de levaduras en la cámara de Neubauer y se determinó la cantidad necesaria para obtener un inóculo con una población inicial de  $1 \times 10^4$  células/ml. Después de un crecimiento de 20 generaciones se considera a *S. cerevisiae* como adaptada a la concentración de NaCl expuesta. Una vez adaptada, se sembró una alícuota en una caja de Petri con medio YPD sólido adicionado con la concentración de sal correspondiente y se incubó a 30° C hasta que alcanzaron su crecimiento óptimo; la caja de petri posteriormente se almacenó a 4° C. Las levaduras adaptadas se resembraron en medio YPD sólido cada 30 días. La adaptación de *S. cerevisiae* a una concentración de NaCl 0.68 M se realizó a partir de levaduras crecidas en una concentración de NaCl 0.34 M y la adaptación de levaduras a una concentración de NaCl 1 M fué iniciada a partir de la línea adaptada a una concentración de NaCl 0.68 M. Las líneas adaptadas se mantuvieron almacenadas a una temperatura de 4° C.

### 3.1.-Cosecha de Levaduras.

Para cosechar *S. cerevisiae* control y adaptada en fase logarítmica ( $1 \times 10^7$  células/ml) se transfirieron las células a tubos Corex (EE.UU.A.) con capacidad de 25 ml. Se centrifugaron a 15900 x g (10,000 rpm en rotor JS-13 de la centrifuga Beckman J2-21, EE.UU.A.) durante 10 min a 15° C. Se decantó el sobrenadante y el botón celular se traspaso mediante pipeta Pasteur a tubos Eppendorff estériles, congelándose el botón a -70° C por un mínimo de 30 minutos o hasta que las levaduras fueran empleadas para la determinación de la actividad enzimática.

#### 4.-Extracción de Proteínas

##### 4.1-Extracción de proteínas para determinar actividad de glutamato deshidrogenasa (GDH- NAD<sup>+</sup>) (EC 1.4.1.2) .

El botón celular de levaduras se colocó en un tubo Kimax de 100 mm x 14 mm esterilizado, se agregaron 2 ml de una solución amortiguadora de extracción de acuerdo a Joy (1973) (Trizma-base 50 mM, CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O 1 mM, β-mercaptoetanol 5 μM), se homogeneizó la mezcla a 4° C con un politrón (Ultra-Turrax T25, Janke & Kunkel Co., EE.UU.A.) a una velocidad de 20,000 rpm durante 10 min; entre cada minuto se dieron intervalos de 20 seg de inactividad para evitar el calentamiento de la muestra. El homogenado se transfirió con una pipeta Pasteur a un tubo Eppendorf y se centrifugó a 14,400 x g (9,500 rpm rotor JS-13, centrifuga Beckman J2-21, EE.UU.A.) durante 30 minutos a 4° C . El sobrenadante se mantuvo a 4° C y se utilizó para la determinación enzimática.

##### 4.2-Extracción de proteínas para cuantificar la actividad de glutamino sintetasa (GS) (EC 6.3.1.2).

El proceso es igual al seguido para la extracción de la glutamato deshidrogenasa excepto que se empleó una solución amortiguadora de extracción de acuerdo a Lea, P.J. (1990), la cual contiene:

	Solución Stock	volúmen utilizado	Concentración final
Trizma-base pH 7.8 ácido	0.5 M	8,780 μl	50 mM
etilendiamintetraacetato (EDTA)	0.5 M	20 μl	1 mM
ditrioteitol (DTP)	10 mM	1,000 μl	1 mM
MgSO <sub>4</sub>	1 M	100 μl	10 mM
glutamato de Sodio	5 mM	100 μl	500mM
volúmen total		10,000 μl	



El sobrenadante de la centrifugación (extracto crudo) se utilizó para la determinación enzimática de la glutamino sintetasa.

#### 5.-Electroforésis de proteínas totales en geles de poliacrilamida.

Las proteínas totales de *S. cerevisiae* se separaron por medio de una electroforésis en geles unidimensionales de poliacrilamida bajo condiciones desnaturizantes, de acuerdo a Laemmli (1970). El gel es discontinuo y consta de dos tipos de geles: uno concentrador y otro separador; la concentración final del gel separador es de 10 %.

##### Gel separador (10%)

solución base de acrilamida (30:0.8)	
(acrilamida 30% w/v y bisacrilamida 0.8% w/v)	4.2 ml
solución amortiguadora 8X Trizma-base 3M pH 8.8	3.1 ml
Dodecil sulfato de sodio (SDS) al 10 %	126 $\mu$ l
persulfato de amonio (APS) al 10 %	150 $\mu$ l
N, N, N', N' tetrametilendiamina (TEMED)	10 $\mu$ l
agua	5 ml

La mezcla se vació entre dos placas de vidrio de 63 cm<sup>2</sup> de superficie con una separación de 1 mm. hasta completar una superficie de 45 cm<sup>2</sup> aproximadamente, el espacio restante se llenó con agua desionizada. Una vez polimerizado el gel, se eliminó el agua y se agregó el gel concentrador, el cual se preparó a una concentración final de 5%.

Gel concentrador (5%)

solución base de acrilamida (30:0.8)	850 $\mu$ l
solución amortiguadora 4X Trizma-base 0.5 M pH 6.8	1.25 ml
Dodecil sulfato de sodio (SDS) al 10 %	50 $\mu$ l
persulfato de amonio (APS) al 10 %	75 $\mu$ l
N, N, N', N' tetrametilendiamina (TEMED)	9 $\mu$ l
agua	2.85 ml

En la parte superior se colocó el peine formador de pocillos, el cual se retiró al polimerizar el gel. Se montó en una cámara de electroforesis (Bio-Rad, EE.UU.A.) y se agregó la solución amortiguadora de corrida (1X) pH 8.3, la cual se preparó a partir de 60 ml de una solución amortiguadora 5X [Trizma-base 9.0 g, glicina 43.2 g, dodecil sulfato de sodio (SDS) 3.0 g, aforando a 600 ml con agua desionizada] y se llevó a un volumen final de 300 ml con agua desionizada.

Al extracto crudo de proteínas totales de levadura se les agregó solución amortiguadora de carga 2X [Trizma-base 125 mM pH 6.8, dodecil sulfato de sodio (SDS) al 4%, glicerol al 20 %,  $\beta$ -mercaptoetanol al 10% y azul de bromofenol (2 mg/ml)] en una proporción 1:1 (v/v). Las muestras se hirvieron en baño maría durante 5 minutos para posteriormente colocarse en los pocillos con capacidad de 20  $\mu$ l con una microjeringa Hamilton (Sigma, EE.UU.A.). La concentración de proteína cargada en cada pozo se uniformizó en base a la cuantificación obtenida extrapolando en la curva patrón del método de Bradford (1976).

La cámara de electroforesis se conectó a una fuente de poder (BRL, modelo 250, EE.UU.A.) y se aplicaron 200 voltios hasta que el colorante indicador llegó al final de la placa de electroforesis. Una vez terminada la corrida, el gel se colocó en una solución de tinción

(azul de Coomassie (Sigma, EE.UU.A.) 0.125%, metanol 50%, ácido acético 10%), se colocó en un incubador "Shaker Bath" (Lab-Line, EE.UU.A.) durante 30 minutos, para teñir de manera uniforme el gel; el exceso de colorante del gel se eliminó con una solución desteñidora (metanol 40%, ácido acético 7% y agua 53%), hasta que se apreciaron sólo bandas nítidas; el gel se colocó en una solución de metanol al 25 %, para su mantenimiento.

#### **5.1-Deshidratación y montaje de gel de electroforesis en láminas de celofán.**

En una charola que contenía solución para deshidratación de geles (glicerol al 3%, ácido acético al 10%, aforar con agua desionizada), se colocó una placa de vidrio y sobre ésta se puso una hoja de celofán y sobre ésta el gel. Se cubrió el gel con otra hoja de celofán; se fijó al vidrio con un marco de plástico el cual se sujetó a la placa con la ayuda de pinzas prensa-papel tipo clip cuidando de que no se formaran burbujas sobre el gel. La deshidratación se llevó a cabo a temperatura ambiente durante un periodo de dos a tres días

#### **6.-Determinación de las actividades enzimáticas**

##### **6.1.-Determinación de la actividad de la glutamato deshidrogenasa (EC 1.4.1.2) (GDH- NAD') de levadura. Reacción aminativa.**

La reacción se llevó a cabo en cubetas de plástico para espectrofotómetro con capacidad de 1 ml, las cuales contienen la mezcla de reacción reportada por Joy (1973) con los siguientes reactivos y concentraciones:

	Concentración final	volúmen utilizado
Trizma-base pH 8.2	100 mM	566 $\mu$ l
$\alpha$ -cetoglutarato	10 mM	166 $\mu$ l
NH <sub>4</sub> Cl	100 mM	166 $\mu$ l
adenin nicotinamida dinucleótido reducido (NADH)	160 mM	33 $\mu$ l
extracto enzimático		66 $\mu$ l
volumen total		1000 $\mu$ l

Las cubetas se incubaron a 30° C sin NADH durante 5 min en un baño de agua acoplado al espectrofotómetro (Beckman DU-7500, EE.UU.A.); el NADH se agregó para iniciar la reacción, mezclando por inversión. Se leyó a 340 nm cada 20 segundos durante 5 minutos registrándose la disminución de la absorbencia. La reacción se realizó por triplicado, la temperatura en el compartimento de la celda del espectrofotómetro se mantuvo constante a 30° C mediante el baño acoplado. Con los datos obtenidos del espectrofotómetro se elaboró una gráfica de absorbencia contra tiempo en la que se utilizó sólo la parte lineal de la reacción.

La actividad enzimática de la glutamato deshidrogenasa en su reacción aminativa y desaminativa se calculó a partir de la siguiente expresión

$$A = \frac{(Abs/min) \times v}{E \times V \times d}$$

En donde:

- Abs/min** = cambio en la absorbencia por minuto.  
**v** = volúmen final de la mezcla de reacción (ml).  
**V** = volúmen de la preparación enzimática utilizada (extracto crudo en ml).  
**E** = coeficiente de extinción molar del NADH a 340 nm (6.22 cm<sup>2</sup>/micromol).  
**d** = distancia del paso de luz a través de la celda (1 cm).

La actividad se expreso como micromoles de NADH transformados /minuto/mililitro de preparación enzimática. La actividad especifica se obtuvo dividiendo éste valor por los miligramos de proteína que contenia 1 ml de la preparación utilizada.

**6.2-Determinación de la actividad enzimática de la glutamato deshidrogenasa (GDH-NAD<sup>+</sup>) (EC 1.4.1.2) de levadura. Reacción desaminativa.**

Se modificó la mezcla de reacción del método utilizado por Loyola-Vargas y Sánchez de Jiménez (1984) para cuantificar la actividad desaminativa de glutamato deshidrogenasa la cual contenia:

	volúmen utilizado	Concentración final
Trizma-base pH 9.4	700 $\mu$ l	100 mM
glutamato de sodio	166 $\mu$ l	60 mM
adenin nicotinamida		
dinucleótido (NAD <sup>+</sup> )	66 $\mu$ l	600 $\mu$ M
extracto crudo	66 $\mu$ l	
volumen total	1,000 $\mu$ l	

La mezcla de todos los componentes, excepto el NAD<sup>+</sup>, se incubó a 30° C durante 5 min en celdas de plástico para espectrofotómetro, iniciándose la reacción al añadir el NAD<sup>+</sup>. Se registro el incremento en la absorbencia a 340 nm cada 20 segundos durante 5 min en el espectrofotómetro (Beckman DU-7500, EE.UU.A.),

### 6.3-Determinación de la actividad de la glutamino sintetasa (EC

#### 6.3.1.2) (GS) de levadura.

En la reacción de síntesis de glutamino sintetasa la incorporación de hidroxilamina como sustrato en lugar del amonio da como producto  $\gamma$ -glutamihidroxamato. Se realizó una modificación del método original de Kanamori y Matsumoto (1972) para obtener un volumen final de 100  $\mu$ l; las proporciones y concentraciones utilizadas fueron:

	Solución Stock	Volúmen utilizado	Molaridad final
Trizma-base pH 7.5	0.2 M	16.6 $\mu$ l	33.2 M
MgSO <sub>4</sub>	1.0 M	3.3 $\mu$ l	33 mM
NH <sub>2</sub> OH	0.1 M	10.0 $\mu$ l	10 mM
adenosín trifosfato (ATP)	0.05M	6.6 $\mu$ l	3.3 mM
cisteína	0.1 M	3.3 $\mu$ l	3.3 mM
		-----	
volúmen de la mezcla de reacción		39.8 $\mu$ l	
extracto con la enzima		43.6 $\mu$ l	
		-----	
volúmen parcial		83.4 $\mu$ l	
glutamato de Sodio	0.5 M	16.6 $\mu$ l	83 mM
		-----	
volúmen total		100.0 $\mu$ l	

La reacción se realizó en tubos Eppendorf con capacidad máxima de 750  $\mu$ l y la reacción comienza con la adición del glutamato para totalizar un volumen final de 100  $\mu$ l. Los tubos se mezclaron con ayuda de un vortex; el blanco tiene todos los componentes y la reacción se detiene agregando una solución de cloruro férrico para considerarla como el tiempo cero, incubándose con las demás muestras. Se incubó a 37°C durante 30 minutos en un Heat-Block (VWR Scientific, EE.UU.A.).

La formación de  $\gamma$ -glutamihidroxamato fue determinada por la adición de 30  $\mu$ l de una solución de cloruro férrico reportada por O'Neal y Joy (1973).

	Solución Stock	volúmen utilizado
FeCl <sub>3</sub> (disuelto en HCl 0.2 N)	0.36 M	10.0 $\mu$ l
HCl	0.67 M	10.0 $\mu$ l
ácido tricloroacético (TCA)	0.20 M	10.0 $\mu$ l

Esta solución para la reacción y permitió determinar colorimetricamente el producto formado. Los tubos fueron mezclados vigorosamente en el vortex. Para eliminar a las sales precipitadas se centrifugaron durante 1 min en una microfuga (IEC, Micro-MB) . Se tomaron 70  $\mu$ l de esta mezcla y se colocaron en una cubeta de cuarzo para espectrofotómetro (Sigma, EE.UU.A.) con capacidad mínima de 50  $\mu$ l. Se midió la diferencia de absorbencia respecto a cada blanco a 540 nm en un espectrofotómetro (Pharmacia, LKB-Ultrospec III, EE.UU.A.). La concentración de  $\gamma$ -glutamihidroxiato formado fue determinada extrapolando los valores de absorbencia en una curva patrón.

### 6.3.1.-Curva patrón de $\gamma$ -glutamihidroxiato.

Para determinar la concentración del producto formado se elaboró una curva patrón, en la cual la mezcla de reacción para cuantificar actividad de glutamino sintetasa fue elaborada con todos los componentes excepto ATP. Se utilizó una solución de  $\gamma$ -glutamihidroxiato (2mg/ml) (Sigma, EE.UU.A.) y la solución amortiguadora de extracción para glutamino sintetasa.

Solución	Concentración de $\gamma$ -glutamihidroxiato ( $\mu$ g/ $\mu$ l)					
	blanco	10	20	30	40	50
mezcla de reacción ( $\mu$ l)	56.4	56.4	56.4	56.4	56.4	56.4
$\gamma$ -glutamihidroxiato ( $\mu$ l) ----	5	10	15	20	25	
Sol. amortiguadora de extracción ( $\mu$ l)	43.6	38.6	33.6	28.6	23.6	18.6
	-----	-----	-----	-----	-----	-----
volúmen total( $\mu$ l)	100	100	100	100	100	100

Se agregaron 30  $\mu$ l de la solución de cloruro férrico y se leyó su absorbencia a 540 nm en el espectrofotometro. Se realizó por triplicado y con los datos obtenidos se elaboro una regresión lineal, la cual se grafico para obtener la curva patrón de absorbencia contra concentración de  $\gamma$ -glutamihidroxiato.

**6.3.2.-Ensayo para determinar la formación de  $\gamma$ -glutamihidroxiato en diferentes tiempos de incubación.**

La formación del producto por la actividad de glutamino sintetasa se determinó cada 5 minutos durante 30 minutos con el fin de saber si la actividad de la enzima era constante a través del tiempo; a partir de los valores obtenidos, se realizó una gráfica de producto formado contra tiempo.

**7.-Cuantificación de proteína.**

Para determinar la concentración de proteínas totales de los extractos se realizó una modificación al método original de Bradford (1976), disminuyendo el volumen final en el que se lleva la reacción. Los reactivos utilizados en la elaboración de una curva patrón fueron:

Trizma-base 50 mM pH 7.8

Reactivo de Bradford. (Bio-Rad, No.Cat.500-0006, EE.UU.A.)

Solución estandar de albúmina bovina (BSA) 1mg/ml.

Las concentraciones que fueron empleadas se muestran a continuación:

	Blanco							
Solución estandar								
de albumina (1mg/ml) ( $\mu$ l)	2	4	6	8	10	15	20	0
Trizma -base 50 mM ( $\mu$ l)	138	136	134	132	130	125	120	140
Reactivo de Bradford( $\mu$ l)	60	60	60	60	60	60	60	60
Total en $\mu$ l	200	200	200	200	200	200	200	200



Se realizó por triplicado. La mezcla se colocó en tubos Eppendorf con capacidad de 750  $\mu$ l, se incubaron por cinco minutos a temperatura ambiente, leyendo el cambio de absorbencia a 595 nm en un espectrofotómetro (Pharmacia, LKB- UltrospecIII, EE.UU.A.); el blanco se empleó para calibrar el aparato. Se realizó una regresión lineal para obtener la curva patrón. Las muestras problema se diluyeron con Trizma-base 50 mM pH 7.8 en un volumen final de 140  $\mu$ l para que los valores de absorbencia queden dentro de la curva patrón y se adicionaron 60  $\mu$ l de reactivo de Bradford para completar un volumen de 200  $\mu$ l totales.

#### **8.- Análisis estadístico.**

Los resultados obtenidos fueron estudiados mediante un análisis de varianza aleatorio por medio del cual se determinó si los cambios en la actividad enzimática eran significativos entre sí; la probabilidad utilizada fue de 0.01 ( $P < 0.01$ ). Si el cambio entre los resultados es significativo se denotará como tal agregando el valor de la probabilidad empleada ( $P < 0.01$ ) en el análisis.

## VI. RESULTADOS

### 1.- Crecimiento de *S. cerevisiae*.

El crecimiento de la población de levadura control y de las levaduras crecidas en medio YPD adicionado con concentraciones de NaCl 0.34 M, 0.68 M y 1 M se siguió a través del tiempo. En la Figura 2 se observa que conforme se aumenta la concentración de sal, disminuye la velocidad de crecimiento de las levaduras. Después de 13 horas de haberse realizado la inoculación, el número de la población control es de  $6.3 \times 10^6$  células/ml y la población crecida con una concentración de NaCl 0.34 M alcanza un valor similar de  $6.1 \times 10^6$  células/ml. Sin embargo, concentraciones de NaCl 0.68 M y 1 M disminuyen dramáticamente el número poblacional, obteniéndose valores de  $5.2 \times 10^5$  y  $5 \times 10^4$  células/ml respectivamente. En la Figura 3 se aprecia cómo la fase logarítmica de crecimiento de las poblaciones de levaduras crecidas con concentraciones de NaCl 0.68 y 1 M, tiene una duración de 40 y 50 horas respectivamente, iniciándose la fase estacionaria a partir de las 60 horas.

#### 1.1.-Tiempo de generación para cada población.

Una vez establecida la curva de crecimiento para las distintas poblaciones de levaduras, a partir de ellas se determinó el tiempo en el que se duplica el número de la población celular, tanto de las levaduras control como de las adaptadas a concentraciones crecientes de NaCl.

<u>Levadura</u>	<u>Tiempo de generación</u>	
Control	54	min
0.34 M NaCl	87	min
0.68 M NaCl	182	min
1.0 M NaCl	231	min

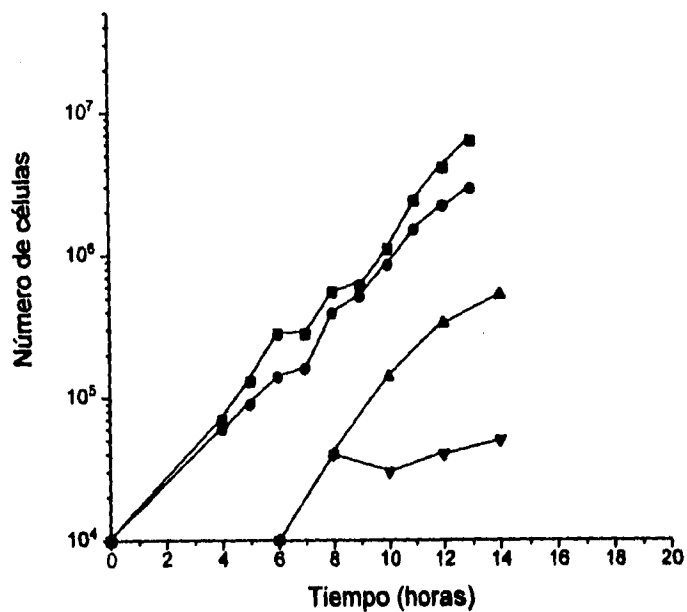


Figura 2.- Curva de crecimiento de *S. cerevisiae*. Crecimiento de levaduras en medio YPD líquido sin sal y adicionado con concentraciones de NaCl 0.34 M, 0.68 M y 1 M. El tiempo cero se inicio con un inóculo de  $1 \times 10^4$  células/ml; las levaduras fueron crecidas a una temperatura de  $30^\circ \text{C}$  como se indico en material y método. (■, levadura control; ●, levadura en medio YPD adicionado con 0.34 M NaCl; ▲, levadura en medio YPD adicionado con 0.68 M de NaCl; ▼, levadura en medio YPD adicionado con 1 M NaCl).

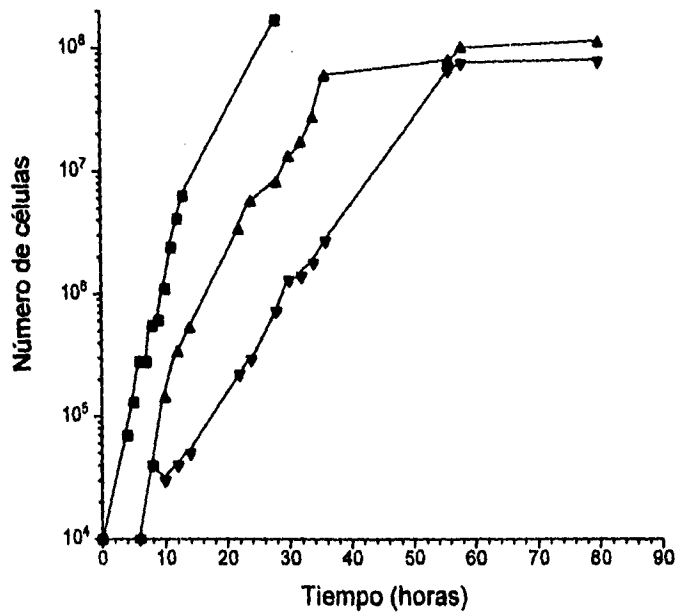


Figura 3.- Curva de crecimiento de *S. cerevisiae*. Tiempo en el que se alcanza una fase estacionaria de crecimiento de *S. cerevisiae* con NaCl 0.68 M y 1 M comparado contra la población control. Crecimiento de levaduras en el medio YPD adicionado con diferentes concentraciones de NaCl. Se partió de poblaciones en las que de manera progresiva se fue aumentando la concentración de NaCl. El número de células se calculó contándolas en una cámara de Neubauer como se indico en material y método. Los símbolos representan: ■, levadura control; ▲, levadura con 0.68 M de NaCl; ▼, levadura con 1 M NaCl).

Para realizar posteriormente la determinación de las actividades enzimáticas se utilizaron cultivos con una densidad poblacional aproximada de  $1 \times 10^7$  células/ml. Con el objeto de obtener este número poblacional a un mismo tiempo de cosecha se utilizaron los datos de duplicación celular anteriores; para cada una de las diferentes líneas adaptadas se establecieron diferentes tiempos de incubación: 14 horas para las levaduras control y para las crecidas con 0.34 M de NaCl, en el que el inóculo inicial fue de  $1 \times 10^4$  células/ml y  $2 \times 10^4$  células/ml respectivamente. Para las poblaciones de levaduras crecidas en un medio YPD adicionado con 0.68 M y 1.0 M de NaCl el tiempo de incubación fue de 24 horas y se inició con un número poblacional de  $1 \times 10^5$  células/ml y  $3 \times 10^5$  células/ml respectivamente.

## **2.- Electroforesis de proteínas totales de *S. cerevisiae*.**

Los resultados de la separación de proteínas totales de levadura control y adaptadas a concentraciones crecientes de sal realizada mediante electroforesis se muestran en la Figura 4. Del carril 1 al carril 4 se utilizaron extractos proteicos obtenidos con las soluciones de extracción para la enzima glutamino sintetasa y del carril 5 al carril 8 se utilizó una solución de extracción para la enzima glutamato deshidrogenasa. En todos los pozos se colocaron aproximadamente 27  $\mu\text{g}$  de proteína total, excepto en el último carril que corresponde a las levaduras adaptadas a una concentración de NaCl 1M en el que la concentración es de 0.48  $\mu\text{g}$ . Se observa que una banda con un peso molecular aproximado de 32.6 kDa disminuye su intensidad en las poblaciones celulares tratadas con sal. El análisis del patrón electroforético se puede apreciar mejor en la Figura 5, en la que la concentración de proteína colocada en cada carril es similar al gel anterior (27  $\mu\text{g}$ ) y en el último carril la concentración cargada fue de 0.72  $\mu\text{g}$ . Este gel presenta una mejor resolución de las proteínas de levaduras crecidas con NaCl 0.34 M y 1 M. Analizando las diferencias en la intensidad de tinte de las bandas de proteínas de la población de levaduras control contra las tratadas con sal en los

dos geles (Figuras 4 y 5) se tiene la siguiente comparación de comportamiento:

Peso molecular (kDa)	Comportamiento
63	Presente en levaduras crecidas con NaCl 1 M (Fig. 5).
53.6	Se observa en células crecidas con NaCl 0.68 M (fig.4) y crecidas con NaCl 1 M (Fig. 5).
45	Presente en la población de levaduras crecidas con NaCl 0.68 M (Fig 4).
41.5	Se observa en células crecidas con NaCl 1 M (Fig. 5).
32.6	Disminuye su intensidad en la población celular crecida bajo concentración de 0.34 M NaCl (Fig 4).
29	Presente en levaduras adaptadas a NaCl 0.34 M (Figs. 4 y 5) y 1M (Fig. 5)
26	Se observa en la población con NaCl 0.34 M (Fig.4).

Este análisis confirma que ciertas proteínas son sintetizadas preferencialmente durante una situación estresante mientras que algunas otras se sintetizan en menor cantidad o dejan de sintetizarse (Ashburner y Bonner, 1979).

Por otra parte, dado que una de las respuestas más evidentes de *S. cerevisiae* ante una situación de estrés por sal es la de acumular glicerol como un osmolito protector (Watson, 1970; Brown, 1972; Larsson, 1987; André, 1991; Ölz, 1993), resulta razonable suponer que algunas de las actividades enzimáticas relacionadas con su síntesis podrían verse afectadas. El glicerol es sintetizado preferencialmente a partir de gliceraldehido 3-fosfato, compuesto que puede provenir a su vez de glucosa o piruvato-oxaloacetato (Adler, 1985). Ya que estas dos últimas moléculas pueden originarse a partir de compuestos nitrogenados

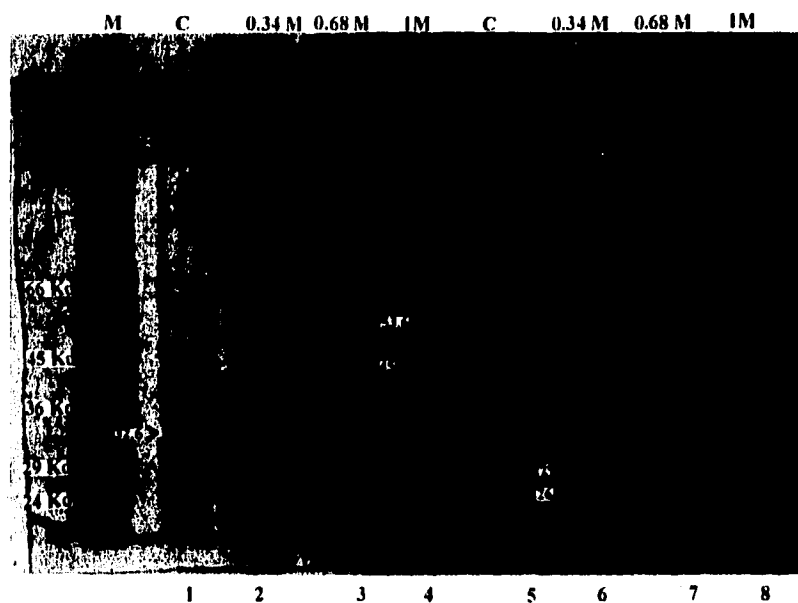


Figura 4.-Proteínas totales de *S. cerevisiae* control y adaptadas a concentraciones crecientes de NaCl separadas mediante electroforésis en condiciones desnaturalizantes. A la izquierda se localizan los marcadores de peso molecular. Se cargaron aproximadamente 27  $\mu$ g de proteína. Los cuatro primeros carriles corresponden a proteínas obtenidas con solución de extracción para la enzima glutamino sintetasa (GS); carril 1.- levaduras control; 2.- levaduras adaptadas a NaCl 0.34 M; 3.- levaduras adaptadas a NaCl 0.68 M; 4.- levaduras adaptadas a NaCl 1 M. Los carriles 5 al 8 presentan el mismo orden de los carriles 1 al 4 excepto que las proteínas fueron obtenidas empleando la solución de extracción para glutamato deshidrogenasa (GDH).

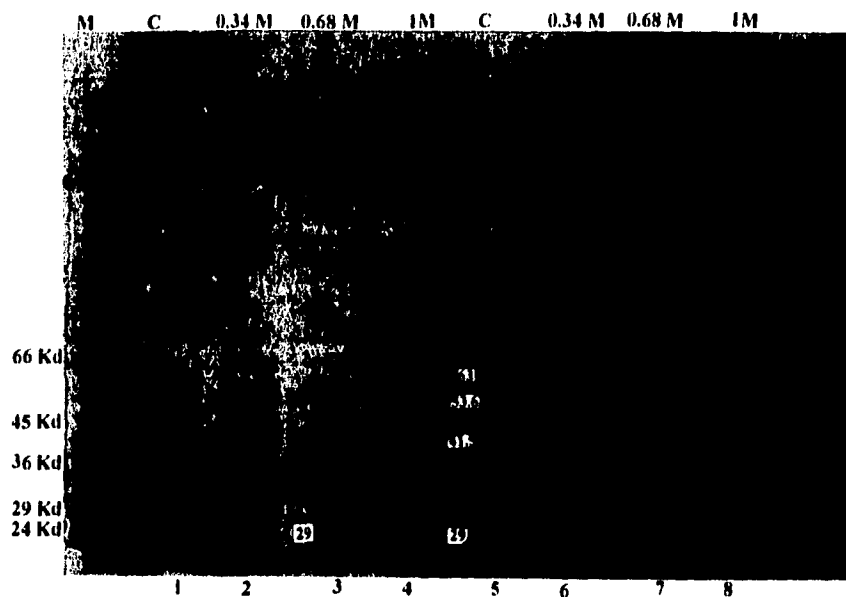


Figura 5.-Separación de proteínas totales de *S. cerevisiae* obtenidas y tratadas de igual forma que en la Figura 4, excepto que en el carril 8 la concentración de proteína fue de 0.72  $\mu$ g. Carril 1.- levaduras control; 2.- levaduras con NaCl 0.34 M; 3.- levaduras con NaCl 0.68 M; 4.- levaduras adaptadas a NaCl 1 M; carril 5.- levaduras control; 6.- levaduras con NaCl 0.34 M; 7.- levaduras con NaCl 0.68 M; 8.- levaduras adaptadas a NaCl 1 M.



que en muchos otros organismos participan en la respuesta al estrés por la sal, se decidió investigar si esta situación también podría estar afectando la actividad de dos enzimas críticas del metabolismo nitrogenado de levadura como la glutamato deshidrogenasa y la glutamino sintetasa.

### **3.- Determinaciones enzimáticas.**

#### **3.1.- Actividad de la glutamato deshidrogenasa (EC 1.4.1.2.) de *S. cerevisiae*. Reacción aminativa.**

La actividad aminativa de la glutamato deshidrogenasa (EC 1.4.1.2.) de *S. cerevisiae* crecida tanto en medio YPD líquido sin sal como en medio adicionado con NaCl a concentraciones finales de 0.34 M, 0.68 M y 1 M se muestra en la Figura 6, en la que se observa que la actividad de la enzima de levaduras control tiene un valor de 1.34  $\mu$ molas/min/mg proteína mientras que levaduras crecidas con una concentración de NaCl 0.34 M presentan un incremento de dicha actividad respecto del control. Sin embargo, la actividad de la glutamato deshidrogenasa en células crecidas a una concentración de NaCl 0.68 M muestra una disminución con respecto a la población anterior misma que se acentúa en las levaduras adaptadas a una concentración de NaCl 1 M.

#### **3.2.- Actividad de la glutamato deshidrogenasa (EC 1.4.1.2.) de *S. cerevisiae*. Reacción desaminativa.**

*S. cerevisiae* tiene dos tipos de glutamato deshidrogenasa; una dependiente de NAD<sup>+</sup> y otra de NADP<sup>+</sup> (Doherty, 1970). En condiciones normales de crecimiento, la concentración interna de NAD<sup>+</sup> en el citoplasma es mayor que la de NADH, por lo que la reacción desaminativa, en la cual se degrada el glutamato, es favorecida sobre la reacción aminativa (Miller y Magasanik, 1990). Esto se puede apreciar en la Figura 7 en la que el valor de la actividad desaminativa de la glutamato deshidrogenasa dependiente de NAD<sup>+</sup> en

levaduras control es de 3.4  $\mu$ molas/min/mg proteína. Los valores obtenidos para levaduras crecidas en medio YPD con una concentración de NaCl 0.34 M disminuyeron de manera no significativa respecto de los valores control. Para levaduras crecidas con una concentración de NaCl 0.68 M el valor obtenido es similar al control. Sin embargo, se registro un incremento significativo ( $P < 0.01$ ) en la actividad de glutamato deshidrogenasa para *S. cerevisiae* en medio YPD con una concentración de NaCl 1M; este incremento alcanzo un valor dos veces mayor que el obtenido con el control.

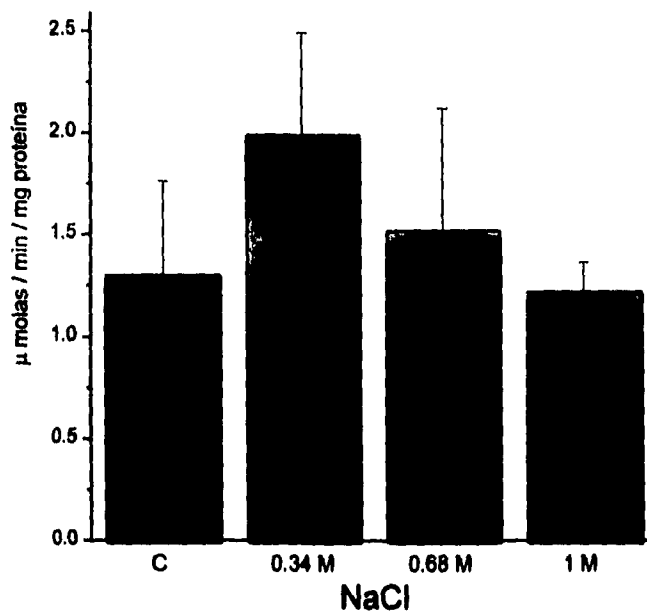


Figura 6.- Actividad aminativa de la glutamato deshidrogenasa de *S. cerevisiae*. La concentración de NaCl hace referencia a la concentración final en el medio YPD en el que se crecieron las levaduras. Cada una de las barras graficadas representa el promedio de por lo menos 4 experimentos diferentes realizados por triplicado.

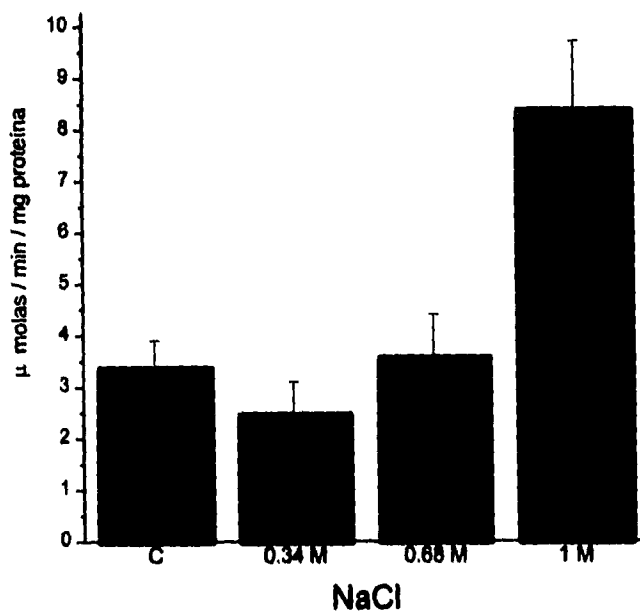


Figura 7.- Actividad desaminativa de la glutamato deshidrogenasa de *S. cerevisiae*. La actividad se determinó a partir de extractos de proteínas totales obtenidos de levaduras crecidas o adaptadas en medio YPD con una concentración final de NaCl como se indica en la figura. Los valores obtenidos fueron de por lo menos cuatro experimentos diferentes realizados cada uno por triplicado. La diferencia entre la actividad del control y la de las células adaptadas a 1 M de NaCl es estadísticamente significativa ( $P < 0.01$ ).

La reacción desaminativa (glutamato  $\rightarrow$  amonio +  $\alpha$ -cetoglutarato) de la glutamato deshidrogenasa se vio favorecida sobre la reacción aminativa ( $\alpha$ -cetoglutarato + amonio  $\rightarrow$  glutamato) como se mencionó anteriormente. Al calcular la relación existente entre los resultados obtenidos de estas dos reacciones se obtuvieron los siguientes valores para cada una de las poblaciones estudiadas:

	Población			
	Control	0.34M NaCl	0.68 M NaCl	1 M NaCl
<u>Relación reacciones desaminativa aminativa</u>	2.61	1.25	2.36	6.88

Estos datos muestran que existe un incremento en la relación de las actividades de la enzima para la población crecida con NaCl 1M éste incremento es de casi tres veces respecto a la población control.

### 3.3.- Actividad de la glutamino sintetasa (EC 6.3.1.2.) de *S. cerevisiae*.

El glutamato puede ser metabolizado por las enzimas glutamato deshidrogenasa (EC 1.4.1.2.) y glutamino sintetasa (EC 6.3.1.2.); ésta última cataliza la amidación del glutamato de acuerdo a la siguiente reacción:



Si se sustituye en la reacción el amonio por hidroxilamina se forma  $\gamma$ -glutamilhidroxamato (Kanamori y Matsumoto, 1972). Empleando esta sustitución, se cuantificó la actividad de síntesis de la

glutamino sintetasa de *S. cerevisiae* crecida en medio YPD sin NaCl y con concentraciones crecientes de ésta sal.

### **3.3.1.- Determinación de la cantidad de producto formado.**

El  $\gamma$ -glutamilhidroxamato formado por la actividad de la glutamino sintetasa es seguido de manera colorimétrica a 540 nm. Para determinar la concentración de producto formado se realizó una curva patrón con  $\gamma$ -glutamilhidroxamato comercial, el cual se agregó a la mezcla de reacción conteniendo todos los reactivos excepto ATP. La Figura 8 muestra una curva patrón típica utilizada en la determinación de la actividad enzimática.

### **3.3.2.- Formación de producto a través del tiempo.**

Para corroborar lo apropiado del tiempo de incubación reportado por otros autores (Mitchell y Magasanik, 1983) se siguió el curso de la formación de producto contra tiempo de incubación en el extracto enzimático. La Figura 9 muestra cómo el producto formado mantiene una relación directamente proporcional al tiempo de incubación por lo que en los experimentos definitivos se decidió seguir el curso de la reacción durante 30 minutos.

### **3.3.3.- Cuantificación de proteína.**

Para determinar la actividad enzimática específica de la glutamino sintetasa y de la glutamato deshidrogenasa se requirió conocer la cantidad de proteína total contenida en los extractos de levadura. Esto se determinó mediante una modificación del método de Bradford (1976). Los valores de absorbencia obtenidos a 595 nm fueron comparados contra una curva patrón como la de la Figura 10, en la que se utilizó albúmina bovina a concentraciones conocidas. Se realizó una regresión lineal con los datos obtenidos para utilizarse como curva patrón y así poder extrapolar los valores de absorbencia de los extractos enzimáticos.

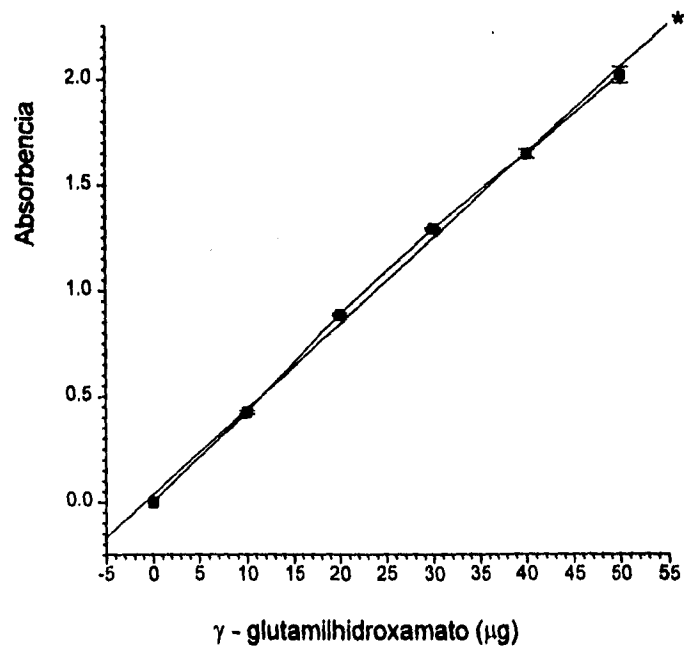


Figura 8.- Curva patrón de  $\gamma$ -glutamihidroxamato. Se utilizó  $\gamma$ -glutamihidroxamato de una solución a una concentración de 2mg/ml. La mezcla de reacción contenía todos los reactivos excepto ATP. Se utilizó solución amortiguadora de extracción en lugar de extracto enzimático. La línea que se encuentra uniendo ■ representa los datos obtenidos con su respectiva desviación estandar; la línea con \* representa el análisis de regresión lineal que se obtuvo a partir de los mismos datos graficados.

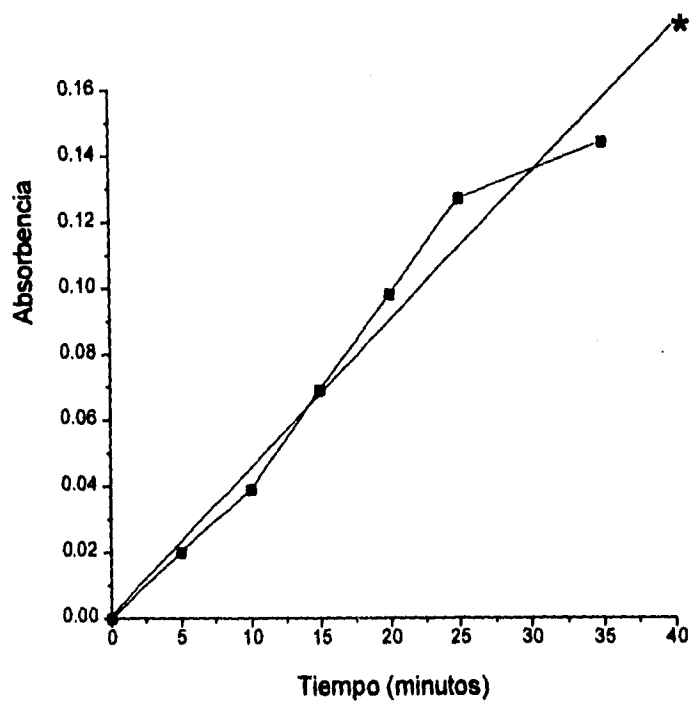


Figura 9.- Formación de  $\gamma$ -glutamihidroxamato en función del tiempo. Extractos totales de *S. cerevisiae* control fueron incubados a 30 ° C deteniéndose la reacción de mezclas independientes cada 5 minutos. Se grafica la absorbencia obtenida a 540 nm. ■ representa a los datos obtenidos; \* representa el análisis de regresión lineal.

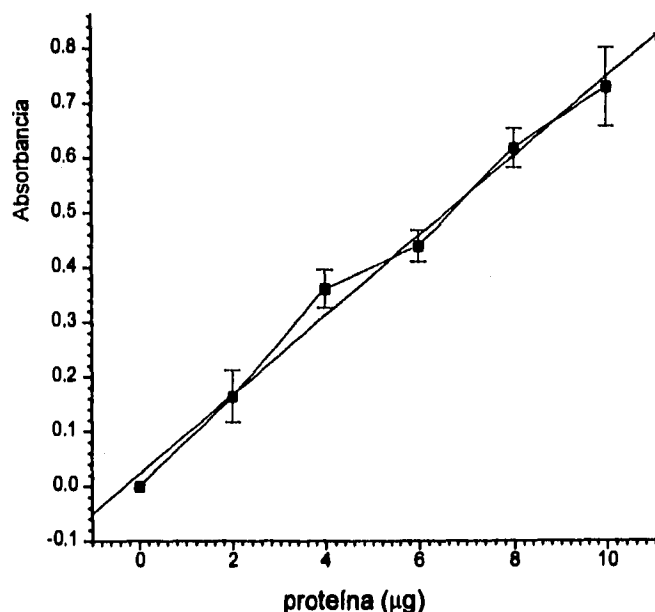


Figura 10.- Curva patrón de proteína (seroalbúmina bovina). La cuantificación de proteína se realizó utilizando el método de Bradford (1976), midiendo la absorbancia en un espectrofotómetro a 595 nm. Se utilizó una solución stock a una concentración de 1 mg/ml de albúmina bovina. Cada símbolo ■ representa el promedio de tres lecturas y la desviación estándar entre ellos y el símbolo \* el análisis de regresión lineal de los mismos.

### 3.3.4.-Actividad de la glutamino sintetasa (EC 6.3.1.2.) de *S. cerevisiae* control y adaptada a concentraciones crecientes de NaCl.

La actividad de la enzima glutamino sintetasa de *S. cerevisiae* control y adaptada a concentraciones crecientes de NaCl se muestra en la Figura 11. Los valores corresponden al producto formado durante un tiempo de incubación de 30 minutos. Para las concentraciones de 0.34 M y 0.68 M de NaCl se observa un incremento proporcional de la actividad respecto a la concentración de sal. Sin embargo, las levaduras crecidas con una concentración de NaCl 1 M presentan un cambio en la actividad, al disminuir esta con respecto a la población de levaduras adaptadas a NaCl 0.68 M.



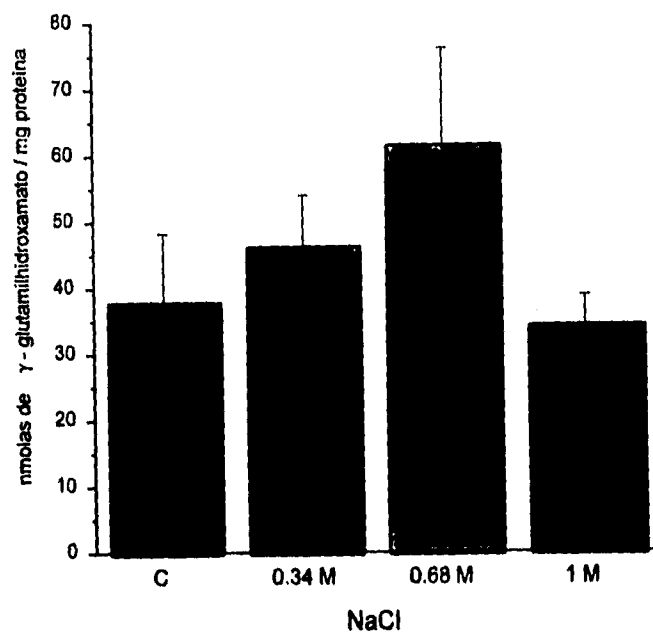


Figura 11.-Actividad de la glutamino sintetasa de *S. cerevisiae*. Se midió la actividad de síntesis de la enzima la cual se expresó como nmol de  $\gamma$ -glutamihidroxamato formado por miligramo de proteína por minuto. Se graficaron los valores obtenidos de por lo menos cuatro experimentos independientes realizados cada uno por triplicado.

## VII. DISCUSIÓN

Concentraciones crecientes de NaCl en el medio de cultivo de *S. cerevisiae* disminuyen su velocidad de crecimiento, alteran el patrón electroforético de proteínas totales y modifican la actividad de las enzimas glutamato deshidrogenasa y glutamino sintetasa.

El incremento en la concentración de cloruro de sodio afecta de manera directa parámetros de crecimiento de las levaduras como son el aumento en el tiempo de duplicación y por ende la duración de la fase logarítmica de crecimiento. Las levaduras con una concentración de NaCl 0.34 M presentaron un crecimiento similar al de las levaduras control. Sin embargo, en las levaduras crecidas en un medio con una concentración final de NaCl 1 M su tiempo de duplicación aumenta 4 veces con respecto al control como se muestra en la figura 3. Esta disminución en la velocidad del crecimiento podría deberse a que la sal es un agente estresante por lo que las células, al canalizar su metabolismo hacia el manejo de esta situación, probablemente reducen los recursos destinados para el crecimiento (Watson, 1970; Ölz, 1993).

El estudio del patrón electroforético de proteínas de *S. cerevisiae* control comparado contra las poblaciones crecidas bajo concentraciones crecientes de sal muestra varias diferencias. Estas aparecen fundamentalmente como bandas de proteínas con un peso molecular relativo de 26, 29, 41.5, 45, 53.6 y 63 kDa. Este grupo de proteínas, a excepción de las proteínas con peso aproximado de 41.5 y 53.6 kDa, concuerda con lo reportado por Varela y colaboradores (1992) quien estudio a *S. cerevisiae* bajo una concentración de NaCl 0.7 M.

Es interesante hacer notar que la banda proteica que se observa con un peso molecular aproximado de 63 kDa, podría pertenecer a la familia de proteínas de choque calorico Hsp60 de levaduras, las cuales muestran una homología con la proteína groEL de *E. coli* (Mager y Ferreira, 1993). Se sabe que la síntesis de las proteínas de

estrés se presenta como respuesta a una amplia variedad de situaciones adversas, es decir, no son el producto de un solo tipo de agente estresante que pueda provocar daño celular (Hightower, 1991). Una de las funciones de la familia Hsp60 en levadura es la de facilitar el ensamble posterior a su traducción de polipéptidos y proteínas que se importan a la mitocondria (Mager y Ferreira, 1993). Esta familia de proteínas tiene asociada una actividad de hidrólisis de ATP. Bajo condiciones de estrés por NaCl, *S. cerevisiae* también presenta un incremento en el recambio de ATP lo cual es reportado por Watson en 1970 y Larsson y Gustafsson en 1987. La energía metabólica de la célula podría ser canalizada, entre otros eventos, hacia un aumento en la actividad de bombas de tipo iónico como la que promueve la salida de Na<sup>+</sup> (Ölz, 1993).

La banda proteica de aproximadamente 26 kDa que se observa en los geles de electroforesis podría corresponder a la reportada como una familia de proteínas de choque calórico en levaduras (Hsp 26) las cuales tiene la habilidad de formar estructuras poliméricas denominadas granulos de choque calórico (HSGs, heat shock granules) los que se acumulan en la región perinuclear de la célula (Tuite et al., 1990). También se ha observado la expresión de las proteínas de 26 kDa durante la fase estacionaria de crecimiento de levaduras (Kurtz et al., 1986).

Por otra parte, se sabe que en situaciones de estrés no solo se sintetizan preferencialmente algunos grupos de proteínas, sino que también dejan de sintetizarse otros (Ashburner y Bonner, 1979). En el presente estudio se observa que una banda proteica con un peso aproximado de 32 kDa disminuye su intensidad en las poblaciones tratadas con sal; en este sentido, no se tiene referencia sobre la disminución de algun tipo de familia proteica de levadura bajo una situación de estrés, ya que la mayoría de los reportes hacen referencia sólo al incremento en la síntesis de proteínas (Mager y Ferreira, 1993).

En base a lo anterior podemos decir que *S. cerevisiae* expuesta a concentraciones crecientes de NaCl presenta cambios en su expresión génica, lo cual se refleja como patrones proteicos diferentes entre la población control y las crecidas en un medio adicionado con sal.

Por lo que respecta al estudio de la actividad de enzimas críticas del metabolismo nitrogenado, la actividad aminativa de la glutamato deshidrogenasa de levaduras crecidas bajo concentraciones de NaCl 0.34 M muestra un incremento, mientras que las crecidas con NaCl 0.68 M y 1 M tienen una actividad similar a las levaduras control. El incremento de actividad en las levaduras en presencia de NaCl 0.34 M podría deberse a un cambio en la concentración interna de NADH y  $\text{NH}_4$ , lo cual favorecería la incorporación de amonio a la molécula de glutamato. Lo anterior se podría comprobar midiendo los niveles de amonio interno a esta concentración de sal.

La reacción desaminativa de la glutamato deshidrogenasa dependiente de NAD presenta una ligera disminución en la actividad de las células crecidas con concentraciones de NaCl 0.34 M y 0.68 M. Sin embargo, a mayor concentración de NaCl (1 M) se presenta un cambio significativo en la actividad, la cual es más de dos veces la del control ( $p < 0.01$ ). La glutamato deshidrogenasa en su reacción desaminativa tiene un papel preponderadamente catabólico al desaminar al glutamato para producir amonio y  $\alpha$ -cetoglutarato. Este último podría ser utilizado como fuente de carbón por las levaduras ya que es un intermediario en el ciclo de los ácidos tricarbónicos y al aumentar su concentración se podría favorecer la producción de glicerol (Yagi et al., 1992). Como ya se mencionó en la introducción, se sabe que el glicerol es uno de los principales osmoprotectores sintetizados por la levadura durante el estrés por sal (Varela, 1992; Larsson, 1987; André, 1991; Ölz, 1993). Por lo tanto, es claro que durante esta situación se requerirán mayores cantidades de sus precursores. Ello podría ocurrir a partir del  $\alpha$ -cetoglutarato el cual, al ingresar al ciclo de los ácidos tricarbónicos sería transformado hasta oxaloacetato. Este compuesto, a su vez, puede ser convertido en fosfoenolpiruvato el cual puede ser utilizado para la

síntesis de gliceraldehído-3-fosfato y, finalmente, glicerol (Jennings, 1984). A este respecto resulta interesante señalar que en otros organismo como *E. coli* se ha observado que la poza intracelular de aminoácidos está constituida por un 80% de glutamato y un 8 a 10 % de glutamina (Bastarrachea et al., 1993) lo cual podría significar una elevada concentración de una molécula potencialmente precursora del glicerol. Algo análogo podría estar ocurriendo en la levadura en la que se ha reportado que la concentración citoplásmica de glutamato corresponde al 73% del total de los aminoácidos citosólicos (Zacharski y Cooper, 1978); por otra parte Miller y Magasanik (1990) ponen de manifiesto la importancia del glutamato y la glutamina en *S. cerevisiae* en donde el 85% del nitrógeno usado para la síntesis de aminoácidos proviene del glutamato. La glutamina aporta el 15% del nitrógeno restante y es también utilizada para la síntesis de purinas y pirimidinas (Miller y Magasanik, 1990). Este grupo de investigadores también proponen que el producto del gen *GLN3*, el cual es la enzima glutamato deshidrogenasa, es un punto en el que converge el metabolismo nitrogenado y parte del metabolismo del carbono (Coschigano et al., 1991). La figura 12 muestra de manera general las enzimas involucradas directamente en el metabolismo del glicerol en hongos y especialmente en levaduras (Adler, 1985) en donde se aprecia la etapa final de su biosíntesis.

De cualquier manera, el estudio del metabolismo de los polioles en levaduras es también escaso y sólo se ha confinado a algunos aspectos (Jennings, 1984) por lo que se desconoce cual es el mecanismo exacto involucrado desde el ciclo de los ácidos tricarbónicos hasta la producción de glicerol en las levaduras sometidas a un estrés por NaCl (Yagi et al., 1992). En el presente estudio la actividad de la glutamato deshidrogenasa en su reacción desaminativa de levaduras crecidas con NaCl 1M parecería favorecer el mecanismo propuesto líneas arriba.

La glutamato sintetasa de levaduras no presentó cambios significativos en su capacidad catalítica bajo las concentraciones de NaCl estudiadas (0.34 M, 0.68 M y 1 M). Probablemente, la actividad

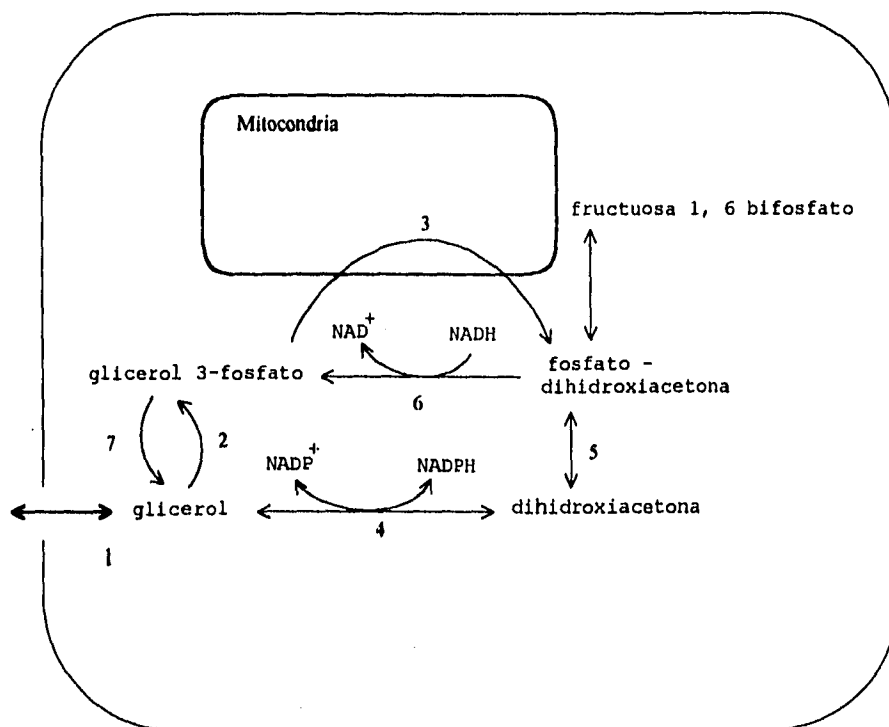


Figura 12.- Metabolismo del glicerol en levaduras. (1) proteínas transportadoras de glicerol; (2) glicerol cinasa; (3) gliceraldehido 3 fosfato deshidrogenasa mitocondrial; (4) glicerol deshidrogenasa; (5) dihidroxiacetona cinasa; (6) gliceraldehido 3 fosfato deshidrogenasa dependiente de NAD<sup>+</sup>; (7) fosfatasa. Tomado de Adler, 1985.

de la enzima se mantiene estable debido a la presencia de rutas colaterales que mantienen constante la poza de glutamato, como es el caso de transaminasas que incorporan el nitrógeno de aminoácidos como la lisina, ácido aspártico y la alanina a ésta molécula (Large, 1986).

Al analizar el comportamiento de la glutamino sintetasa de levaduras crecidas con una concentración de NaCl 0.34 M se presentó un ligero incremento en su actividad. Por otra parte, para la misma población celular se presentó un aumento en la actividad de la enzima glutamato deshidrogenasa en su actividad aminativa. En este sentido, ambas enzimas parecen estar catalizando la incorporación de una molécula de amonio ya sea al glutamato o al  $\alpha$ -cetoglutarato.

Como conclusión, puede mencionarse que aún cuando levadura no parece sintetizar osmolitos nitrogenados cuando es sometida a estrés por sal, se observaron cambios en las actividades de dos enzimas muy importantes en el metabolismo nitrogenado de las células. Una de dichas actividades, la reacción desaminativa catalizada por la glutamato deshidrogenasa, sufrió una alteración claramente significativa. Ello podría estar relacionado con la síntesis aumentada del glicerol por parte de *S. cerevisiae* durante el estrés por sal. Asimismo, se observó la aparición de dos bandas proteicas correspondientes a un peso molecular calculado de 41.5 y 53.6 kDa que no habían sido reportadas hasta el momento.

## VIII. REFERENCIAS

- Adler L., A. Blomberg y A. Nilsson. (1985). Glycerol Metabolism and Osmoregulation in the Salt-Tolerant Yeast *Debaromyces hansenii*. *J. Bacteriol.*, **162**: 300-306.
- Anderson J.A., S.S. Huprikar, L.V. Kochian, W.J. Lucas y R. F. Gaber. (1992). Functional expression of a probable *Arabidopsis thaliana* potassium channel in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **89**: 3736-3740.
- Andre L., A. Hemming y L. Adler. (1991). Osmoregulation in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.*, **286**: 13-17.
- Arakawa T. y S.N. Timasheff. (1982). Stabilization of Protein Structure by Sugars. *Am. Chem. Soc.*, **21**: 6536-6544.
- Arakawa T. y S.N. Timasheff. (1985). Mechanism of Poly(ethylene glycol) Interaction with Proteins. *Am. Chem. Soc.*, **24**: 6756-6762.
- Ashburner M., J. Bonner., (1979). The induction of Gene Activity in *Drosophila* by Heat Shock. *Cell* **17**:241-254.
- Bastarrachea F., L. Camarena y A. V. Osorio., (1993). La regulación del metabolismo del nitrógeno en *Escherichia coli* trece años después. *Memorias del Congreso Conmemorativo del Jubileo del Instituto de Investigaciones Biomédicas*. UNAM. México. pp 213-222.
- Boyer P.D., (1970). *The Enzymes*. Vol. I, Academic Press. N.Y. 559 pp.
- Bradford M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of the protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, **72**: 248-254.
- Brewster J.L., T. de Valoir, N.D. Dwyer, E. Winter y M. C. Gustin. (1993). An Osmosensing Signal Transduction Pathway in Yeast. *Science* **259**: 1760-1763.
- Brown A. y J. Simpson. (1972). Water Relations of Sugar-tolerant Yeasts: the Role of Intracellular Polyols. *J. Gen. Microbiol.*, **72**: 589-591.
- Brown A. D., (1990). *Microbial Water Stress Physiology*. J. Wiley & Sons. Great Britain. 313 pp.
- Close T. J., P. J. Lammers. (1993). An Osmotic Stress Protein of Cyanobacteria is Immunologically Related to Plant Dehydrins. *Plant Physiol.*, **101**: 773-779.



- Cooper T.G. (1982). Nitrogen Metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*.  
 en: The Molecular Biology of the Yeast *Saccharomyces*.  
 Strathern J. N., Jones E.W. y Broach J.R. Editores. Cold Spring  
 Harbor Laboratory. U.S.A., pp 39-99.
- Coschigano P. W., S. M. Miller y B. Magasanik. (1991). Physiological  
 and Genetic Analysis of the Carbon Regulation of the  
 NAD-Dependent Glutamate Dehydrogenase of *Saccharomyces*  
*cerevisiae*. *Mol. and Cell. Biol.*, **11**: 4455-4465.
- Csonka L. N. (1989). Physiological and Genetic Response of Bacteria  
 to Osmotic Stress. *Microbiol. Rev.*, **53**: 121-147.
- Csonka L.N. (1991). Prokaryotic Osmoregulation: Genetics and  
 Physiology. *Annu. Rev. Microbiol.*, **45**: 569-606.
- Doherty D. (1970). l-Glutamate Dehydrogenase (Yeast). Methods in  
 Enzymology., vol. **XVII**. pp.850-856.
- Dvorák J., M. Edge y K. Ross. (1988). On the evolution of the  
 daptation of *Lophopyrum elongatum* to growth in saline  
 environments. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **85**: 3805-3809.
- Ellis R. J. y S. M. van der Vies. (1991). Molecular Chaperones.,  
*A. Rev. Biochem.*, **60**: 321-347.
- Epstein E., J.D. Norlyn, D.W. Rush, R.W. Kingsbury, D.B. Kelley. G.A.  
 Cunningham y A.F. Wrona., (1980). Saline Culture of Crops: A  
 Genetic Approach. *Science*, **210**: 399-404.
- Evans D. A., W. R. Sharp, P. V. Ammirato y Y. Yamada.  
 (1983). Handbook of Plant Cell Culture, volumen 1, Mc Millan  
 Publising Co., New York. 468 pp.
- Fitzpatrick E. A. (1984). Suelos su formacion, clasificación y  
 distribucion. Compañia Editorial Continental. Mexico. 256 pp.
- Flowers T. J. y A.R. Yeo. (1988). Ion relations of salt tolerance.  
 en: Solute Transport in Plant Cells and Tissues. Baker D. A. y  
 J. L. Hall editores. Longman Scientific & Technical. England.  
 pp 392-416.
- Gaber R. F., C. A. Styles y G. R. Fink. (1988). TRK1 Encodes a Plasma  
 Membrane Protein Required for High-Affinity Potassium Transport  
 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.*, **8**: 2848-2859.
- Garciadeblas B., F. Rubio, F. J. Quintero, M.A. Bañuelos, R. Haro y  
 A. Rodríguez-Navarro. (1992). Differential expression of two  
 genes encoding isoforms of the ATPase involved in sodium  
 efflux in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Gen. Genet.*, **236**:  
 363-368.

- Gaxiola R., I. F. de Larrinoa, J. M. Villalba y R. Serrano. (1992). A novel and conserved salt-induced protein is an important determinant of salt tolerance in yeast. *EMBO J.*, **11**: 3157- 3164.
- Gething M.J. y J. Sambrook, (1992). *Nature* **355**: 33.
- Gläser H., D. Thomas, R. Gaxiola, F. Montrichard, Y. Surdin-Kerjan y R. Serrano. (1993). Salt tolerance and methionine biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae* involve a putative phosphatase gene. *EMBO J.*, **12**: 3105-3110.
- Hanson A. D., (1982). Metabolic Responses of Mesophytes to Plant Water Deficits. *Ann. Rev. Plant. Physiol.*, **33**: 163-203.
- Haro R., M. A. Bañuelos, F. J. Quintero, F. Rubio y A. Rodríguez-Navarro. (1993). Genetic basis of sodium exclusion and sodium tolerance in yeast. A model for plants. *Physiol. Plant.*, **89**: 868- 874.
- Hemmingsen S. M., C. Woolford, S. M. van der Vies, K. Tilly, D. T. Dennis, C. P. Georgopoulos, R. W. Hendrix y R. J. Ellis. (1988). Homologous plant and bacterial proteins chaperone oligomeric protein assembly., *Nature* **333**: 330-334.
- Heuer B. (1994). Osmoregulatory Role of Proline in Water and Salt Stressed Plants. en: Handbook of Plant and Crop Stress. Pessarakli M. Editor. M Dekker, Inc. USA. pp 363.
- Hightower L., (1991). Heat Shock, Stress Proteins, Chaperones, and Proteotoxicity. *Cell* **66**: 191-197.
- Hoar W.S., (1975). Fisiología General y Comparada, Ed. Omega, España. 854 pp.
- Jennings D.H., (1984). Polyol Metabolism in Fungi. *Advan. in Microbial. Physiol.*, **25**: 149-193.
- Joy K. W., (1973). Control of Glutamate Dehydrogenase from *Pisum sativum* Roots. *Phytochemistry.*, **12**: 1031-1040.
- Kanamori T. y H. Matsumoto. (1972). Glutamine Synthetase from Rice Plant Roots. *Arch. Biochem. Biophys.*, **125**: 404-412.
- 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.
- Kumada Y., D.R. Benson, D. Hillemann, T. J. Hosted, D. A. Rochefort, C.J. Thompson, W. Wohlleben y Y. Tateno. (1993). Evolution of the glutamine synthetase gene, one of the oldest existing and functioning genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **90**: 3009-3013.

- Kurtz S., J. Rossi, L. Petko y S. Lindquist. (1986). An Ancient Developmental Induction: Heat-Shock Proteins Induced in Sporulation and Oogenesis., *Science* **231**: 1154-1157.
- Laemmli U. K. (1970). Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.
- Large P. J. (1986). Degradation of Organic Nitrogen Compounds by Yeasts., *Yeast*, **2**: 1-34.
- Larsson C. y L. Gustafsson. (1987). Glycerol production in relation to the ATP pool and heat production rate of the yeast *Debaryomyces hansenii* and *Saccharomyces cerevisiae*., *Arch. Microbiol.*, **147**: 358-363.
- Latterich M. y M. D. Watson. (1991). Isolation and characterization of osmosensitive vacuolar mutants of *Saccharomyces cerevisiae*., *Mol. Microbiol.*, **5**: 2417-2426.
- Lea P. J., (1990). Methods in Plant Biochemistry. Vol. **3**, Academic Press, London. pp. 258-276.
- Levitt, J. (1980). Responses of Plants to Environmental Stresses. Vol I., Academic Press, New York, 285 pp.
- Le Rudulier D., A. R. Strom, A. M. Dandekar, L. T. Smith y R. C. Valentine. (1984). Molecular Biology of Osmoregulation. *Science* **224**: 1064-1068.
- Lindquist S. y E. A. Craig. (1988). The Heat-Shock Proteins, *Annu. Rev. Genet.*, **22**: 631-677.
- Loyola-Vargas V. M. y E. Sánchez de Jiménez., (1984). Differential Role of Glutamate Dehydrogenase in Nitrogen Metabolism of Maize Tissues, *Plant. Physiol.*, **76**: 536-540.
- Maeda T., S. M. Wurgler-Murphy y H. Saito. (1994). A two component system that regulates an osmosensing MAP kinase cascade in yeast., *Nature* **369**: 242-245.
- Magasanik B., (1992). Regulation of Nitrogen Utilization. en: The Molecular and Cellular Biology of the yeast *Saccharomyces*. Volumen II., Broach J. R., E. W. Jones y J. R. Pringle Editores., Cold Spring Harbor Laboratory Press. pp 283-317.
- Mager W.H. y P.M. Ferreira, (1993). Stress Response of Yeast. *Biochem. J.*, **290**: 1-13.
- Martin J., M. Mayer, T. Langer & F. Ulrich, (1993). The reaction cycle of GroEL and GroES in chaperonin-assisted protein folding. *Nature* **366**: 228-233.

- Measures J. C. (1975). Role of aminoacids in osmoregulation of non-halophilic bacteria. *Nature* **257**:398-400.
- Mendoza I., F. Rubio, A. Rodríguez-Navarro y J.M. Pardo. (1994). The Protein Phosphatase Calcineurin Is Essential for NaCl tolerance of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.*, **269**: 8792-8796.
- Mifflin B. J. y P. J. Lea. (1980). Ammonia Assimilation. en: The Biochemistry of Plants. volumen 5. Stumpf, P.K. y Conn E.E. editores. Academic Press., New York. pp. 169-202.
- Miller S. M. y B. Magasanik. (1990). Role of NAD-Linked Glutamate Dehydrogenase in Nitrogen Metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.*, **172**: 4927-4935.
- Mitchell A. P. y B. Magasanik. (1983). Purification and Properties of Glutamine synthetase from *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.*, **258**: 119-124.
- Nakamura T., Y. Liu, D. Hirata, H. Namba, S. Harada, T. Hirokawa y T. Miyakawa. (1993). Protein phosphatase type 2B (calcineurin)-mediated, FK-506-sensitive regulation of intracellular ions in yeast is an important determinant for adaptation to high salt stress conditions. *EMBO J.*, **12**: 4063-4071.
- Ölz R., K. Larsson, L. Adler y L. Gustafsson. (1993). Energy Flux and Osmoregulation of *Saccharomyces cerevisiae* Grown in Chemostats under NaCl Stress. *J. Bacteriol.*, **175**: 2205-2213.
- O'Neal D. y K. W. Joy. (1973). Glutamine Synthetase of Pea Leaves I. Purification, Stabilization, and pH Optima. *Arch. Biochem. Biophys.*, **159**: 113-122.
- Petes T.D., (1980). Molecular Genetics of Yeast. *Ann. Rev. Biochem.*, **49**: 845-876.
- Pollard A. y R. G. Wyn Jones. (1979). Enzyme Activities in Concentrated Solutions of Glycinbetaine and Other Solutes. *Planta* **144**: 291-298.
- Ramos J., R. Haro y A. Rodríguez-Navarro. (1990). Regulation of potassium fluxes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim. Biophys. Acta.*, **1029**: 211-217.
- Ritossa, F. (1962). A New Puffing Pattern Induced by Temperature Shock and DNP in *Drosophila*. *Experientia* **18**: 571-573.

- Robinson L.C., E.J.A. Hubbard, P.R. Graves, A.A. DePaoli-Roach, P. J. Roach, C. Kung, D. W. Hass, C. H. Hagedorn, M. Goebel, M. R. Culbertson y M. Carlson. (1992). Yeast casein Kinase I homologues; An essential gene pair. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **89**: 28-32.
- Selye H., (1936). A syndrome produced by Diverse Nocuous Agents. *Nature* **138**:32.
- Selye H. (1973). The evolution of the Stress Concept. *Am. Sci.*, **61**: 692-699.
- Stewart G.R., A.F. Mann y P.A. Fentem. (1987). Enzymes of Glutamate Formation: Glutamate Dehydrogenase, Glutamine Synthetase, and Glutamate Synthase. en: *The Biochemistry of Plants*, volumen 5. Stumpf, P. K. y Conn E. E. editores. Academic Press., New York. pp. 271-327.
- Tarczyński M.C., R.G. Jensen y H.J. Bohnert. (1993). Stress Protection of Transgenic Tobacco by Production of the Osmolyte Mannitol. *Science* **259**: 508-510.
- Tuite M. F., N.J. Bently, P. Bossier y I.T. Fitch (1990). Anth. van Leeuwenhoek **58**:147-154. citado en: Mager W.H. y P.M. Ferreira, (1993). Stress Response of Yeast. *Biochem. J.*, **290**: 1-13.
- Varela J. S. C., C. van Beekvelt, R. J. Planta y W. H. Mager. (1992). Osmostress-induced changes in yeast gene expression. *Mol. Microbiol.*, **6**: 2183-2190.
- Watson T.G. (1970). Effects of Sodium Chloride on Steady-state Growth and Metabolism of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Gen. Microbiol.*, **64**: 91-99.
- Wyn R. G. and J. Gorham. (1983). Osmoregulation. en: *Encyclopedia of Plant Physiology*, new series, vol. 12c. "Physiological plant Ecology III". Lange O. Edts. Springer-Verlag, Berlin Germany. pp. 35-54.
- Yagi T., A. Nogami y T. Nishi. (1992). Salt tolerance and glycerol accumulation of a respiration-deficient mutant isolated from the petite-negative, salt-tolerant yeast *Zygosaccharomyces rouxii*. *FEMS Microbiol. Lett.*, **92**: 289-293.
- Yancey, P.H., Clark M.E., Hand S.C., Bowlus R.D. y Somero G.N. (1982). Living with Water Stress: Evolution of Osmolyte Systems. *Science* **217**: 1214-1222.
- Zacharski C.A. Y T.G. Cooper, (1978), Metabolite Compartmentation in *Saccharomyces cerevisiae*, *J. Bacteriol.*, **135**: 490-497.